

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Purificación de los alérgenos mayores  
del Grupo 1 (Der p 1) y Grupo 2 (Der p 2)  
del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*:  
Evaluación de su eficacia diagnóstica en  
población sensibilizada al polvo doméstico**

**Matilde Rodríguez Mosquera  
2007**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**Purificación de los alérgenos mayores  
del Grupo 1 (Der p 1) y Grupo 2 (Der p 2)  
del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*:  
Evaluación de su eficacia diagnóstica en  
población sensibilizada al polvo doméstico**

**Directores:  
Prof. Ramón Pérez Maeztu  
Prof. Ricardo Palacios Peláez**

**Doctorando:  
Matilde Rodríguez Mosquera**

**Madrid, 2007**





## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

**D. Ramón PÉREZ MAEZTU**, Profesor Titular de Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Jefe de Sección del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid y

**D. Ricardo PALACIOS PELÁEZ**, Doctor en Medicina y Cirugía, Licenciado en Ciencias Biológicas, Profesor Colaborador Ephos – Universidad Alcalá de Madrid, y Full Clinical Profesor: School of Medicine (LSUHSC), Lousiana Staqte University. New Orleans,

Como Director y Codirector de trabajo titulado:

***PURIFICACIÓN DE LOS ALÉRGENOS MAYORES DEL GRUPO 1 (DER PE 1) Y GRUPO 2 (DER PE 2) DEL ÁCARO DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS: EVALUACIÓN DE SU EFICACIA DIAGNÓSTICA EN POBLACIÓN SENSIBILIZADA AL POLVO DOMÉSTICO,***

elaborado por la Licenciada **D<sup>a</sup>. Matilde RODRÍGUEZ MOSQUERA** para la obtención del título de Doctor

### **DECLARAN**

Que lleva trabajando bajo nuestra Dirección en este proyecto desde el año 2.003 reuniendo el trabajo todas las condiciones legales y en cuanto a método, rigor científico y aportaciones originales como para constituir su Tesis Doctoral.

Lo que hacemos constar a los efectos legales oportunos en Madrid, a uno de febrero de 2007

**Fdo: Ramón PÉREZ MAEZTU**  
**D.N.I.: 50.660.694 – C**

**Fdo: Ricardo PALACIOS PELÁEZ**  
**D.N.I.: 2.180.668 - S**



## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis Directores de este trabajo por su animo, ayuda constante y total disponibilidad durante la realización del mismo.

A las personas que trabajan en el Laboratorio de Investigación, Desarrollo y Aplicaciones en Diater, sin cuyos conocimientos, capacidad técnica y soporte habría sido imposible el diseño y obtención de las moléculas con las que hemos trabajado.

Al Servicio de Alergología y en general a la Clínica Puerta de Hierro actual y de los años anteriores que han hecho de mi el Médico que soy actualmente.

Al Personal Administrativo, de Enfermería y Médicos, Residentes y de Plantilla, que me han ayudado materialmente en la localización y manejo clínico de cada paciente, y comparten conmigo el trabajo diario.

Gracias a todos ellos y a cuantas personas me han acompañado antes y ahora.



# ÍNDICE

<b>Abreviaturas y acrónimos</b>	<b>1</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>4</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>5</b>
<b>I. REVISIÓN de CONOCIMIENTOS</b>	<b>6</b>
<b>1. Alergia</b>	<b>7</b>
1.1 Definición y mecanismos	7
1.2 Hipersensibilidad inmediata	8
1.2.1: Secuencia de acontecimientos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata	9
1.2.2: La Inmunoglobulina E en la hipersensibilidad inmediata	11
1.2.3: Complejo principal de histocompatibilidad MHC	12
1.2.3.1: Moléculas de clase I	12
1.2.3.2: Moléculas de clase II	13
1.2.3.3: Moléculas de clase III	15
1.2.4: El receptor de la Inmunoglobulina E	15
1.2.5: Células involucradas en la hipersensibilidad inmediata	16
1.2.5.1: Mastocitos	16
1.2.5.2: Basófilos	18
1.2.5.3: Bioquímica y activación de mastocitos y basófilos	18
a) Mediadores de mastocitos y basófilos	20
a.1) Mediadores preformados	20
a.2) Mediadores de nueva síntesis	21

a.3) Citoquinas _____	22
1.2.5.4: Eosinófilos _____	23
1.3 Alérgenos. Origen y obtención _____	25
1.4 Diagnostico e Inmunoterapia en alergia _____	25
<b>2. Los ácaros</b> _____	29
2.1 Biología de los ácaros _____	29
2.2 Taxonomía _____	29
<b>3. Los ácaros como alérgenos</b> _____	30
3.1 Carácter neuromoalergénico de los ácaros del polvo doméstico _____	30
3.2 Diagnostico de la sensibilidad a los ácaros _____	31
<b>4. Alérgenos de ácaros</b> _____	32
4.1 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> _____	33
<b>5. Reactividad cruzada</b> _____	39
 <b>II. HIPÓTESIS</b> _____	 41
 <b>III. OBJETIVOS</b> _____	 43
 <b>IV. MATERIALES y MÉTODOS</b> _____	 45
<b>1. Selección de inmunógenos</b> _____	46
1.1: Alérgenos recombinantes _____	46
1.2: Péptidos _____	54
<b>2. Antisueros experimentales</b> _____	54
2.1: Inmunización y protocolo _____	55
<b>3. Obtencion y procesado de la fuente alérgénica</b> _____	56
3.1: Obtención del extracto _____	56

3.2: Homogeneización	56
3.3: Extracción	56
3.4: Filtración y diálisis	56
3.5: Estabilización	56
3.5.1: Determinación de parámetros analíticos	57
3.5.1.1: Humedad relativa	57
3.5.1.2: Contenido proteico	58
<b>4: Identificación de alérgenos</b>	<b>58</b>
4.1: Determinación de pesos moleculares: Electroforesis SDS-PAGE	58
4.1.1: Descripción de SDS-PAGE	59
4.1.1.1: Tampones y soluciones	59
4.1.1.2: Montaje de las placas	60
4.1.1.3: Preparación de geles: Sistema discontinuo	60
4.1.1.4: Preparación de muestras	61
4.1.1.5: Condiciones electroforéticas	61
4.1.1.6: Tinción	61
4.1.1.7: Determinación de pesos moleculares	62
4.2: Transferencia de bandas proteicas: Western Blot	62
4.2.1: Descripción de inmunotransferencia (Western Blot)	63
4.2.2: Método de transferencia semiseco	64
4.2.2.1: Tinción de membranas de PVDF transferidas: Directa	65
4.2.2.2: Tinción de membranas de PVDF transferidas: Reversible	66
4.2.2.3: Inmunodetección proteínas transferidas a membrana PVDF	66
4.3: Evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección	68
<b>5. Comprobación de similitud con proteínas nativas</b>	<b>69</b>
<b>6. Uso de anticuerpos para purificación de proteínas nativas</b>	<b>69</b>

6.1: Purificación de anticuerpos por columnas de proteína A _____	69
6.1.1: Materiales y reactivos _____	69
6.1.2: Desarrollo _____	70
6.2: Biotinilización _____	71
6.2.1: Materiales y reactivos _____	71
6.2.2: Desarrollo _____	71
<b>7. Unión de IgG a la matriz de proteína A-Sefarosa _____</b>	<b>72</b>
7.1: Materiales y reactivos _____	72
7.2: Desarrollo _____	72
7.3: Reactivos. Cross-linking _____	73
7.4: Desarrollo _____	73
<b>8. Purificación de alérgenos Grupo 1: Der p 1; Grupo 2: Der p 2 _____</b>	<b>73</b>
8.1: Desarrollo _____	73
<b>9. ELISA (Enzyme Linked Inmuno-Sorbent Assay) _____</b>	<b>74</b>
9.1: Cuantificación de Grupos 1 y 2. ELISA doble sándwich _____	74
9.2: ELISA directo: Grupo 1 (Der p 1) y Grupo 2 (Der p 2) _____	76
9.3 ELISA inhibición _____	77
<b>10. Cuantificación de niveles de IgE específica _____</b>	<b>79</b>
10.1: Activación de discos _____	79
10.2: Acoplamiento de las proteínas _____	80
10.3: Técnica de FEIA: Determinación de IgE específica _____	80
<b>11. Toxicidad de alérgenos Grupo 1: Der p 1; Grupo 2: Der p 2 _____</b>	<b>81</b>
11.1 Toxicidad anormal por vía intraperitoneal en ratón _____	81
11.2 Toxicidad anormal por vía intraperitoneal en rata _____	82
11.3 Evaluación de capacidad irritante no específica en rata _____	82
<b>12. Estandarización: actividad biológica _____</b>	<b>83</b>



12.1: Pruebas cutáneas _____	83
<b>V. RESULTADOS</b> _____	85
<b>1. Producción y purificación de recombinantes</b> _____	86
1.1: Grupo 1 (Der p 1)_____	86
1.2: Grupo 2 (Der p 2)_____	86
<b>2. Inmunización: Producción de antisueros</b> _____	88
2.1: Inmunización con péptidos (Der p 1)_____	88
2.2: Inmunización con alérgenos recombinantes (rDer p 2)_____	88
<b>3. Purificación mediante cromatografía de afinidad</b> _____	88
3.1: Der p 1 _____	90
3.2: Der p 2 _____	90
<b>4. Toxicidades</b> _____	91
4.1 Toxicidad anormal por vía intraperitoneal en ratón _____	91
4.2 Toxicidad anormal por vía intraperitoneal en rata _____	91
4.3 Evaluación de capacidad irritante no específica en rata _____	91
<b>5. Actividad alérgica: pruebas cutáneas y estandarización</b> _____	91
<b>6. Sueros: determinación de Ig E específica</b> _____	95
<b>7. Inmunoblot</b> _____	96
<b>8. ELISA inhibición: Potencia alérgica. Valores Ag50</b> _____	96
<b>9. Valores estadísticos</b> _____	97
9.1 Sensibilidad de la actividad biológica de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, frente al extracto de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> _____	97
9.2 Sensibilidad de la actividad biológica de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, frente a la capacidad fijadora de Ig E del extracto de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> _____	98

<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>100</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>104</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>107</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1.... n p	1.... n:	número del cromosoma en referencia al brazo largo p.
1.... n q	1....n:	número del cromosoma en referencia al brazo corto q.
Abs:		absorbancia.
ACF:		adyuvante completo de Freund.
ABTS:		ácido 2,2-azino-di-(3 etilbenzotiazolin) sulfónico.
AIF:		adyuvante incompleto de Freund.
Ag <sub>50</sub> :		valor que define la concentración o masa de alergen que inhibe un 50% del valor directo del ELISA para el mismo
AMPc:		adenosin monofosfato cíclico.
ARN:		ácido ribonucleico.
B:		población linfocitaria.
BSA:		seroalbúmina bovina
BU:		unidad biológica.
Ca:		calcio.
CD <sub>23</sub> :		receptor de baja afinidad para la Ig E (Fc ε RII).
CD <sub>4</sub> :		receptor de célula T para reconocimiento moléculas HLA
clase II.		
CDNA:		ácido desoxido ribonucleico complementario
cm:		centímetro.
cm <sup>2</sup> :		centímetro cuadrado.
Cols.		colaboradores
CPMP:		comité de la EMEA para evaluación de productos medicinales.
Da:		daltons.
DAG:		diacil glicerol.
DMAB:		ácido 3 dimetilaminobenzóico.
DNA:		ácido desoxido ribonucleico.
DSS:		disuccinimidil suberato
ECP:		proteína catiónica del eosinófilo.
EDTA:		ácido etilen-diamino-tetraacético
ELISA:		Enzimoinmunoensayo en placa de poliestireno ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
EMEA:		agencia europea para evaluación de medicamentos.
Fig.		figura
Fc ε RI:		receptor de alta afinidad para la Ig E.
Fc ε RII:		receptor de baja afinidad para la Ig E.
g:		gramo.
GM-GSF:		factor estimulador de crecimiento de granulocitos y macrófagos.
GTP:		guanosina trifosfato.
h:		hora.
H <sub>1.....4</sub> :		tipo de receptor para la histamina.
H <sub>2</sub> O:		agua.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :		agua oxigenada
HCl:		ácido clorhídrico.
HEP:		unidad histamino equivalente por prick.
HRP:		Peroxidasa de rabano picante
HLA:		antígenos de leucocitos humanos.
IC:		índice de reactividad cutánea.
ICH:		conferencia internacional de armonización.

IFN $\gamma$ :	interferón gamma.
Ig:	inmunoglobulina.
IgE:	inmunoglobulina E.
IgG:	inmunoglobulina G.
IL - ...:	interleuquina.....
ITAM:	inmunoreceptor activación de tirosina.
KCl:	cloruro potásico.
KDa:	kilodaltons.
Kg:	kilogramo.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	fosfato potásico.
KU:	kilo unidades..
L:	litro.
LT..C., D., E..:	leucotrienos de clases C., D.,E..
LTP.	proteínas de transferencia de lípidos.
Lyn:	tirosina quinasa.
LB:	Luria Broth
LB-Amp:	Luria Broth/ampicilina
M:	molaridad.
mAb:	anticuerpo(s) monoclonal(es)
mA:	miliamperio.
mg:	miligramo.
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad.
min.:	minuto.
mL:	mililitro.
mM:	mili molar.
mm:	milímetro.
$\mu$ g:	microgramo
$\mu$ L:	microlitro
$\mu$ m:	nanometro
MOI:	multiplicidad de infección
N:	normalidad.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> :	carbonato sódico.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O:	fosfato disódico dihidratado.
NaCl:	cloruro sódico.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O:	fosfato sódico monohidratado.
NaHCO <sub>3</sub> :	bicarbonato sódico.
ng:	nanogramo.
nm:	nanometro.
° C:	grados centígrados.
p/v:	peso / volumen.
PAF:	factor activador de plaquetas.
	PCR: <i>polymerase chain reaction</i> (reacción de cadena de la polimerasa)
pbs:	pares de bases
PBS:	tampón fosfato salino.
PBS-T:	solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% (v/v)
	PBS-T-BSA: solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% (v/v) y seroalbúmina bovina al 1% (p/v)
PG.....:	prostaglandina.
Pfu/mL:	placas de lisis o calvas/mililitro
PI:	fosfatidil Inositol
pI:	punto isoeléctrico
PLA,C:	fosfolipasa A, C

PM:	peso molecular.
PMSF:	phenylmethilsulfonyl fluoride
PVDF:	difluoruro de polivinilideno
r.p.m.:	revoluciones por minuto.
RAST:	Enzimoinmunoensayo con fase sólida en discos de celulosa ( <i>Radio Allergo Sorbent Test</i> )
RNA:	ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa- transcriptasa reversa)
SDS:	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico
SPT:	prueba cutánea ( <i>Skin Prick Test</i> )
T:	población linfocitaria.
TA:	temperatura ambiente
TBS:	tampón tris salino.
TEMED:	N, N, N',N'-tetrametil-etilendiamina.
T <sub>H</sub> 1:	subpoblación de linfocito colaborador.
T <sub>H</sub> 2:	subpoblación de linfocito colaborador.
TNF α:	factor de necrosis tumoral alfa.
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
Tween-20:	polioxietileno-sorbitan monolaurato
UI:	unidad internacional.
v/v:	volumen/volumen
V:	voltios.
W:	watios.
x g:	fuerza centrifuga relative; numero de veces la aceleración de la gravedad.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Teoría Higienista	<b>7</b>
2	Sensibilización y Memoria	<b>9</b>
3	Reacción Inmediata	<b>10</b>
4	Reacción Tardía	<b>10</b>
5	Estructura de receptor de alta afinidad de IgE: FcεRI	<b>15</b>
6	Liberación de mediadores del mastocito	<b>17</b>
7	Liberación de interleuquinas	<b>23</b>
8	Fase tardía: liberación de mediadores	<b>24</b>
9	Paneles con alérgenos para ensayos en microarray	<b>28</b>
10	Principales alérgenos de ácaros	<b>33</b>
11	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	<b>39</b>
12	Resumen de clonación y purificación de proteínas	<b>54</b>
13	Immunoblot de rDer p 1	<b>86</b>
14	Colony-PCR: colonias aisladas de clonaje Fbac1-Der p 2	<b>87</b>
15	SDS PAGE de rDer p 2	<b>87</b>
16	Esquema de purificación de alérgenos mayores	<b>89</b>
17	Resultado cromatografía de afinidad de liberación Der p 1	<b>90</b>
18	Resultado cromatografía de afinidad de liberación Der p 2	<b>90</b>
19	Resultado del inmunoblot realizado en los sueros	<b>96</b>
20	Representación gráfica de los valores Ag <sub>50</sub>	<b>97</b>





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Cromosomas y principales genes implicados en la atopia	<b>12</b>
2	Subpoblaciones de mastocitos humanos	<b>17</b>
3	Activadores de mastocitos y basófilos directos	<b>20</b>
4	Principales efectos biológicos de la histamina	<b>20</b>
5	Eficacia de inmunoterapia: procesos y mecanismos inmunes	<b>26</b>
6	Clasificación taxonómica de principales ácaros domésticos	<b>30</b>
7	Procedimiento de liofilización	<b>57</b>
8	Estandares de pesos moleculares	<b>60</b>
9	Unidades y clases de Ig E específica	<b>81</b>
10	Áreas de pápulas obtenidas con el extracto de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e histamina clorhidrato	<b>92</b>
11	Áreas de pápulas obtenidas con alérgenos Der p 1 y Der p 2	<b>93</b>
12	Áreas de pápulas obtenidas con el extracto de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , los alérgenos Der p 1+ Der p 2 y el extracto de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> desprovisto de los alérgenos Der p 1 y Der p 2	<b>94</b>
13	Actividad alérgénica y estandarización: valor HEP de los alérgenos Der p 1, Der p 2 y Der p 1 + Der p 2	<b>95</b>
14	Valores de IgE específica frente <i>D. pteronyssinus</i> & <i>D. farinae</i>	<b>95</b>
15	Valores Ag <sub>50</sub> de extractos y alérgenos mayores	<b>96</b>
16	Valores de la actividad biológica de los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2	<b>98</b>
17	Valores de la actividad biológica de los alérgenos mayores y fijación de Ig E específica	<b>99</b>
18	Resultados de actividad biológica y potencia alérgénica	<b>102</b>



## **REVISION DE CONOCIMIENTOS**

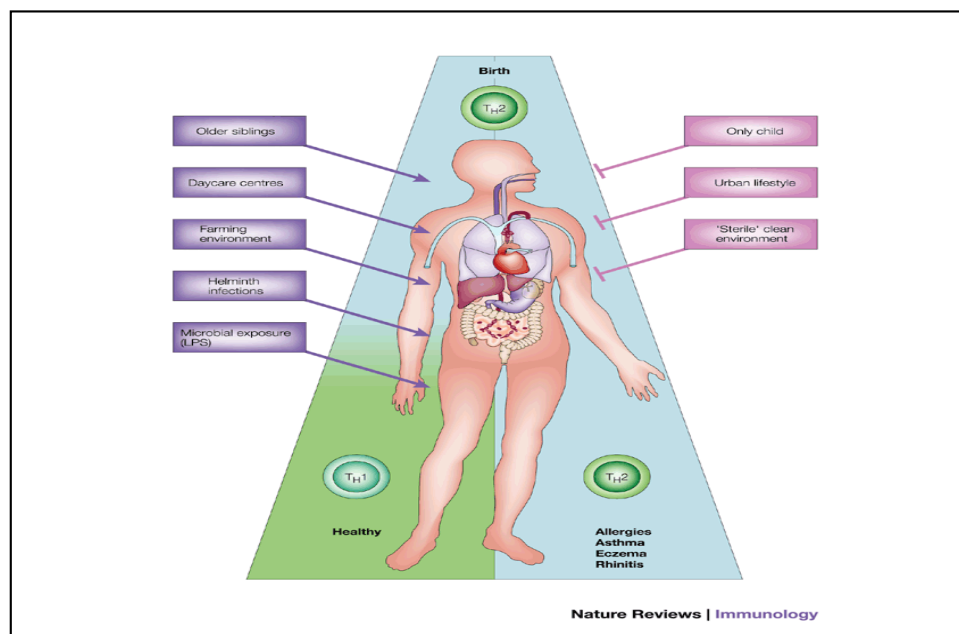


## 1. ALERGIA

### 1.1 Definición y mecanismos:

Las enfermedades alérgicas son actualmente una de las principales causas de alteraciones de la salud en personas de todas las edades. Se considera que al menos 100 millones de personas en el mundo tienen problemas alérgicos (Grant, 1992). Ya en el año 1997, Romagnani considero que se había producido un considerable aumento en la incidencia de la enfermedad atópica en las sociedades industrializadas durante los 30 años previos, estimando que al menos un 20% de la población mundial era susceptible de padecer éste tipo de enfermedades (Romagnani, 1997). El coste anual para el tratamiento del asma en los Estados Unidos se estimó alrededor de los 6000 millones de \$USA (Smith, 1997), y la morbilidad asociada a la atopia requiere elevados costes de medicación. Estos hechos incentivan, la investigación de los mecanismos de la enfermedad, así como el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y supone uno de los mayores retos para investigadores y clínicos de hospitales, así como para las compañías farmacéuticas (von Hertzen, 2000).

La identificación de agrupamientos de citoquinas sobre el cromosoma 5 y del complejo mayor de histocompatibilidad sobre el cromosoma 6 son ejemplos de estudios que ponen de manifiesto el componente genético que acompaña a la enfermedad, aunque muchas veces, estos factores genéticos no explican la creciente incidencia de la misma, por lo que se hace necesario acudir a la investigación epidemiológica en diferentes grupos poblacionales, para intentar relacionar causa y efecto. Estos estudios apuntan a que los factores responsables de dicho crecimiento, podrían estar ligados o en relación con los cambios medioambientales introducidos (Cookson, 2000), las nuevas formas y estilos de vida, las alteraciones en la dieta, y todos ellos confluyen en la denominada teoría higienista (Folkerts, 2000).



**Figura 1: teoría higienista (Busse, 2002)**

El sistema inmunológico está constituido por una serie de elementos celulares y humorales que pueden interactuar específicamente con diferentes tipos de estructuras moleculares (antígenos) con la finalidad de distinguir lo propio de lo ajeno al organismo. La función del sistema es proteger al organismo del daño que eventualmente pueden producir los microorganismos externos y sus toxinas, así como vigilar y eliminar otras alteraciones internas patológicas, como los tumores. Sin embargo el sistema inmune también puede responder inapropiadamente ante sustancias, que aunque extrañas y aparentemente inofensivas, conducen a desarrollar fenómenos de hipersensibilidad de tipo I, conocidos también como de hipersensibilidad inmediata o alergia.

## **1.2 Hipersensibilidad inmediata**

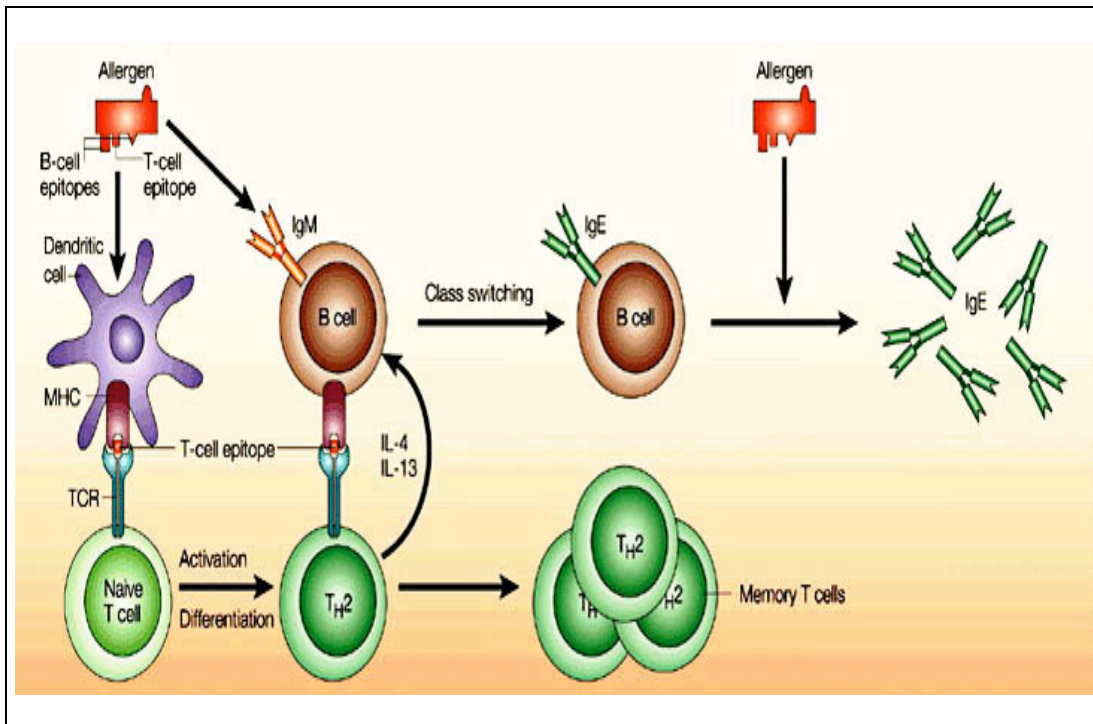
Uno de los mecanismos de reacción más poderosos del sistema inmunitario es la estimulación mediada por la IgE de los mastocitos tisulares y de sus homólogos circulantes, los basófilos sanguíneos (Wills-Karp y cols., 2001). Cuando se produce un entrecruzamiento entre un antígeno y este tipo de anticuerpos asociados a la superficie de las células, se produce una inmediata activación de las mismas, que conduce a la liberación de los mediadores almacenados en sus gránulos. Estos mediadores, en conjunto, producen:

- Aumento de la permeabilidad vascular.
- Vasodilatación.
- Contracción del músculo liso bronquial y visceral.
- Inflamación local

Esta reacción es conocida como “hipersensibilidad inmediata” (Noon, 1911) y tiene importantes repercusiones patológicas. Si es leve puede afectar a uno o dos órganos con mayor o menor gravedad, pero en su forma más extrema, con afectación sistémica, se produce broncoconstricción grave que puede conducir a parada respiratoria. La caída de tensión arterial debida a vasodilatación periférica puede conducir a shock y parada cardíaca y, por tanto, la muerte.

Es característico también de la reacción de hipersensibilidad inmediata, que entre las 2 y 4 horas posteriores a la degranulación de mastocitos y basófilos, se produzca una segunda fase de reacción denominada como “fase tardía” (Mudde y cols., 1990), caracterizada por un infiltrado inflamatorio de eosinófilos, basófilos, neutrófilos y linfocitos. Si estos infiltrados se repiten se produce lesión tisular y posterior fibrosis.

Los individuos que tienden a producir anticuerpos de la clase IgE, en respuesta a diferentes antígenos ambientales y que presentan respuestas de hipersensibilidad inmediata intensa, se denominan “atópicos”.



**Figura 2: Sensibilización y memoria (Valenta, 2002)**

### 1.2.1: Secuencia de acontecimientos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata

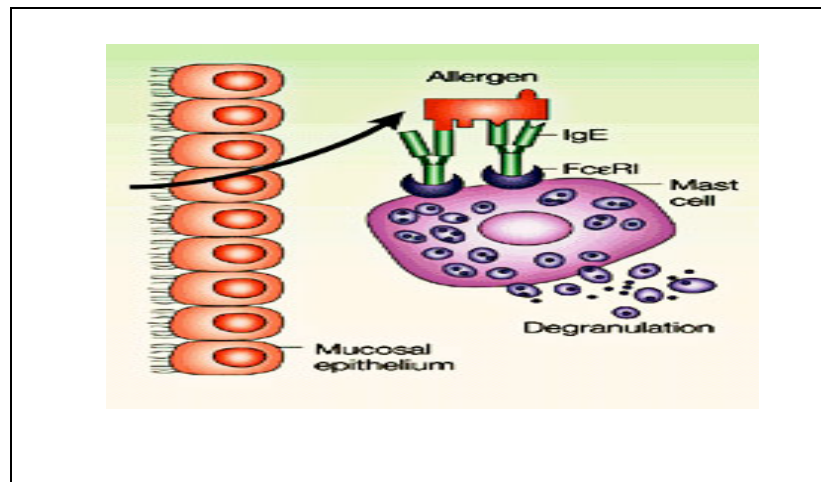
En individuos genéticamente predispuestos, el contacto con un antígeno generalmente de naturaleza proteica, que habitualmente recibe el nombre de “alérgeno” (Wahn y cols., 1997), induce la estimulación de las células T CD4<sup>+</sup>, que representan el 60% de las células T circulantes y que se transforman en células T efectoras o “helper”, denominadas TH2 (Constant y cols., 2000). Estas células TH2 producen y liberan citoquinas IL-4, IL-5, IL-13 (Grunewald y cols., 1998), así como señales mediadas por contacto, que inducen la diferenciación de células B específicas del antígeno, en células productoras de IgE específica del antígeno.

La IgE producida por los plasmocitos circula por el organismo, presentando una vida media de 2 – 3 días y una concentración normal < 80 UI/mL y se fija a receptores específicos de alta afinidad para el Fcε de la cadena pesada de la IgE, denominados FcεRI (Turner y Kinet, 1999), presentes en la superficie de los basófilos sanguíneos circulantes y de los mastocitos de diversos tejidos, en los que se puede mantener hasta 15 días.

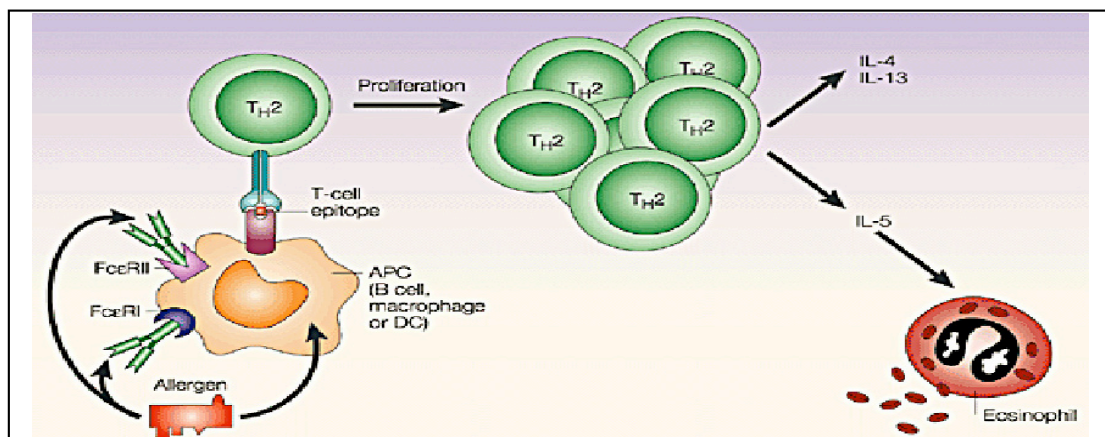
La reintroducción o un ulterior contacto con el mismo antígeno, induce su fijación por puenteo o entrecruzamiento con dos ó más moléculas de IgE específica, a través de sus Fab, en la superficie de mastocitos y basófilos (Saini y cols., 2000). El entrecruzamiento de los receptores Fc inicia una señal de transducción en las células, que conduce a su degranulación y liberación de mediadores preformados al exterior de las mismas, así como a la síntesis y liberación de otros mediadores, que son los responsables de las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas de la hipersensibilidad.

Algunos de los mediadores, inducen una acción inmediata sobre la musculatura lisa y vascular, mientras que otros mediadores estimulan la atracción y acumulo de leucocitos, que originan una acción retardada

La hipersensibilidad inmediata o alergia, puede considerarse una enfermedad dependiente de células  $T_H2$ ; ya que estas células producen IL-4; una citoquina necesaria para la síntesis de IgE, así como IL-5 que estimula activación del eosinófilo propio de los procesos inflamatorios y que es característico de muchas patologías alérgicas (Ying, 1997). Este tipo de reacción es diferente de la hipersensibilidad retardada, una reacción inmunitaria mediada por células  $T\ CD8^+$  y  $CD4^+ T_H1$ , así como macrófagos, en las que los anticuerpos no presentan un papel protagonista.



**Figura 3: Reacción inmediata (Valenta, 2002)**



**Figura 4: Reacción tardía (Valenta, 2002)**



### **1.2.2: La Inmunoglobulina E en la hipersensibilidad inmediata**

La IgE es el isotipo de anticuerpos que contiene la cadena pesada  $\epsilon$ , circulando libremente, como anticuerpo bivalente en concentraciones inferiores a 1 pg/mL. En condiciones patológicas, como las infecciones por helmintos y la atopía, ésta concentración puede incrementarse hasta por encima de los 1.000 pg/mL. Su síntesis depende exclusivamente de la activación de las células T helper CD4+ y concretamente de la subpoblación de células  $T_H2$  y de su secreción de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Abbas y cols., 1991).

Los individuos atópicos, contienen en circulación además de una mayor cantidad de células T secretoras de IL - 4, un incremento en su capacidad de síntesis, que las personas no atópicas.

Las manifestaciones patológicas de la atopía, pueden presentarse en distinto grado en los miembros de una misma familia, pero siempre con el patrón común de disponer de elevadas concentraciones plasmáticas de IgE, en relación con la media normal (Feijen, 2000).

De esta forma el asma, una de las manifestaciones clínicas mas importantes del proceso alérgico, se caracteriza por una hiperreactividad de las vías respiratorias provocada por una obstrucción de las mismas que se encuentra asociada a la región cromosómica ADAM 33 (Van Eerdewegh y cols., 2002) y al cromosoma 20p13 (Jongepier y cols., 2004)

Es un patrón común, asociado con la heredabilidad del incremento de la concentración de IgE, específico de ciertos antígenos o alérgenos, lo cual conlleva a presuponer la implicación de determinados alelos del MHC de clase II.

La base genética de la predisposición a sintetizar IgE, se encuentra influenciada por varios genes (Feijen, 2000), mediante un probable patrón multigénico, de transmisión claramente autosómica, que involucra entre otros los siguientes cromosomas:

CROMOSOMAS	POSIBLES GENES INVOLUCRADOS
2q33	CD28
5q 23 q33	IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-4R, GM-CSF, CD 14
5q32	Receptor $\beta_2$ adrenérgico
6p	Alelos MHC clase II ( $\epsilon$ gen Ir?)
6p21.3	TNF- $\alpha$
7p15.2	IL-6
9q31.1	Tropomyosin-binding protein
11q13	Cadena $\beta$ del Fc $\epsilon$ RI
12q	IFN- $\gamma$
14q	TCR $\alpha$
14q24	Asma – atopia*
16p12.1	IL-4R
19q13	CD 22
Xq28/Yq28	IL-9R
20p13	Asma – atopia

Adaptado de K. C. Barnes: I. Overview, epidemiology and basic science of systemic allergic inflammation. Evidence for common genetic elements in allergic diseases. J Allergy Clin. Immunol Volme 106. Number 5. November 2000  
 \* H. Hakornason. Am J Hum Genet 2002; 71:483-491

**Tabla 1: Cromosomas y principales genes involucrados en la atopia**

### 1.2.3: Complejo principal de histocompatibilidad MHC

El complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histompatibility Complex: MHC*), se denomina “sistema HLA” (*Human Leukocyte Antigens*), se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.3 (Durham I, 1987). La expresión de estos genes, conduce a la agrupación en categorías de las moléculas HLA:

#### 1.2.3.1: Moléculas de clase I:

Glicoproteínas de la superficie celular, que pueden agruparse en la súper familia de las inmunoglobulinas y que tienen como característica una elevada conservación homológica estructural.

Constan de dos cadenas:

- $\alpha$ : glicoproteína polimórfica de 44 kDa, conteniendo 338 residuos de aminoácidos y en la que pueden diferenciarse 3 regiones:

1-281 :            región hidrofílica extracelular

282-306:            región hidrofóbica transmembranal

306-338:            región hidrofílica intracelular.

Se encuentra codificada por genes del complejo HLA del cromosoma 6 y se une en forma no covalente a una proteína no polimórfica de 12 kDa, que se corresponde a la  $\beta_2$  microglobulina, codificada en el 15q21 (So, 1994)

La estructura genómica de los genes HLA de clase I (Kelly y cols., 1991), contiene al menos 17 genes, de los que 6 se encuentran asociados a productos de transcripción, que codifican para las moléculas clásicas y presentan un elevado polimorfismo, dependiente de las áreas étnicas y ubicación geográfica. Los 11 restantes son pseudogenes.

Genes que codifican para moléculas clásicas:

- HLA-A (41 alelos diferentes)
- HLA-B (61 alelos diferentes)
- HLA-C (18 alelos diferentes)

Genes que codifican para moléculas no clásicas:

- HLA-E.
- HLA-F.
- HLA-G.

Las moléculas clásicas HLA de clase I, se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleadas y su expresión se encuentra influenciada por citoquinas. Su función básica es la de presentación de fragmentos de antígenos procesados a la población linfocitaria CD8, fenómeno que se reconoce como “restricción” y que permite que el antígeno sea reconocido, sólo en combinación con una determinada molécula de clase I. Una vez que se ha producido el proceso, se produce la citólisis de la célula presentadora.

#### **1.2.3.2: Moléculas de clase II:**

Se trata de glicoproteínas de superficie celular, encuadradas en la súper familia de las inmunoglobulinas, en forma de heterodímeros formados por dos cadenas glicoproteicas:

- cadena  $\alpha$ : PM 35 kDa.; que presenta 2 dominios ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ), residuos 1-84 y 85-178 respectivamente y que se corresponden a la región hidrofílica extracelular.
- Cadena  $\beta$ : PM 28 kDa.; que presenta 2 dominios ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ), residuos 1-91 y 92-192 respectivamente y que se corresponden a la región hidrofílica extracelular.

Las regiones transmembranal hidrofóbica e intracelular hidrofílica, complementan la estructura de la glicoproteína. Ambas cadenas en asociación no covalente, están compuestas por 229 y 337 aminoácidos respectivamente.

Estructuralmente las moléculas de clase II, son similares a las de clase I; pero presentan sin embargo una conformación más abierta en el lugar de unión al antígeno, lo cual conlleva a que pueda interaccionar con péptidos de elevado peso molecular (Brown y cols., 1993).

Su organización génica, presenta una región reguladora o promotor, que corresponde a una región reguladora HLA-D centromérica y tres subregiones teloméricas:

- HLA-DP
- HLA-DR
- HLA-DQ
- 

que corresponden en los humanos a los genes:

- DP $\alpha$  y DP $\beta$ .
- DR $\alpha$  y DR $\beta$
- DQ $\alpha$  y DQ $\beta$

Las tres secuencias de estos genes del promotor, persisten evolutivamente y son denominadas “boxes” (Y, X y W); encontrándose separadas por unos 20 pares de bases, con lo que los factores de transcripción podrían interaccionar entre sí, siendo necesarias para la correcta expresión de los genes del HLA de clase II.

En general los genes del HLA de clase II de las diferentes subregiones presentan las siguientes estructuras:

- Subregión HLA-DR: Contiene un único gen DRA de muy bajo polimorfismo y 9 genes DRB.
- Subregión HLA-DQ: Contiene dos grupos de genes DQA y DQB, habiéndose establecido hasta la actualidad 14 alelos DQA y 19 alelos DQB. Los grupos de genes DQA2 y DQB2 son pseudogenes.
- Subregión HLA-DP: Contiene dos grupos de genes DPA1 y DPB1, DPA2 y DPB2; siendo los últimos pseudogenes.

Las moléculas de clase II se encuentran distribuidas en las células inmunocompetentes como son las células B, las células presentadoras de antígenos (APC) macrófagos y células dendríticas, así como las células T activadas. Su función es la de presentación de fragmentos de péptidos antigénicos procesados a los linfocitos CD4 en el inicio de la respuesta inmune.

Aún cuando el número de moléculas de clase II del sistema MHC es limitado, sin embargo su funcionalidad principal es la de educación de los linfocitos T, dado que durante su proceso de proliferación y maduración en el timo, se desarrolla el receptor de la célula T. La ausencia de moléculas de clase II, conduce al síndrome de inmunodeficiencia severa combinada, dado que la ausencia en el timo de éste tipo de moléculas, los linfocitos T y B no pueden interaccionar con el sistema HLA y por tanto se eliminan, siendo afectados los pacientes de una linfopenia T.

### 1.2.3.3: Moléculas de classe III:

La región de la clase III, contiene los genes que codifican para las proteínas del complemento:

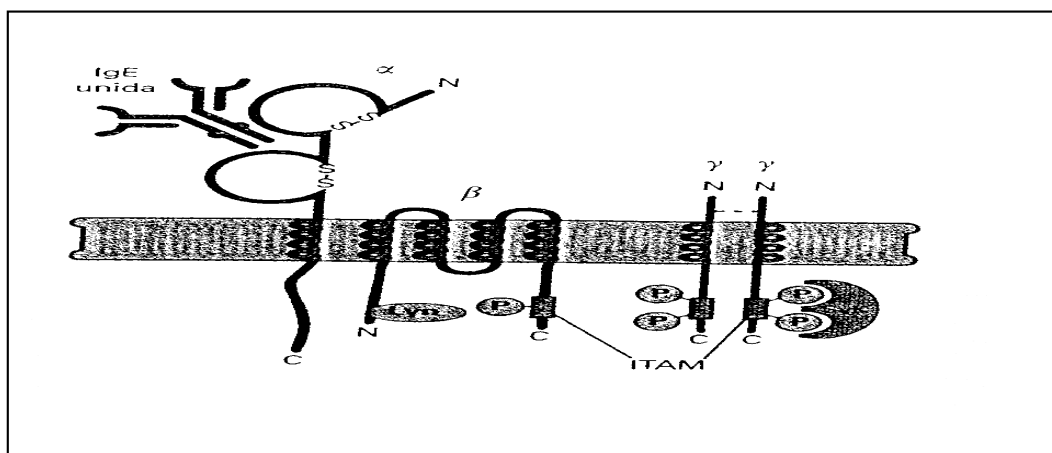
- C2.
- C4.
- Factor B.

así como el gen para la citocromo P450 oxidasa (CYP), TNF  $\alpha$  y  $\beta$  y las HSP70. Su estructura génica, la conforman dos grupos de genes A y B.

#### 1.2.4: El receptor de la Inmunoglobulina E:

Los efectos biológicos de la IgE en la hipersensibilidad inmediata están mediados por la expresión de un receptor para el Fc de elevada afinidad de la cadena pesada  $\epsilon$ ; que se denomina Fc $\epsilon$ RI que encontramos en forma constitutiva en los mastocitos y en los basófilos (Bieber, 1992); aún cuando también han sido descritos receptores Fc $\epsilon$ RI en células de Langerhans epidérmicas, macrófagos dérmicos, monocitos y eosinófilos activados; desconociéndose su funcionalidad (Bieber, 1992).

La constante de disociación ( $K_d$ ) que presenta el FcεRI para la IgE es de aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M. Es por ello, que aún cuando la concentración de IgE es muy baja ( $1 \mu\text{g/mL}$  ó  $5 \times 10^{-10}$  M); es sin embargo lo suficientemente elevada para permitir la ocupación de los receptores FcεRI.



**Figura 5: Estructura del receptor de alta afinidad de la IgE: FcεRI**  
Inmunología Celular y Molecular. Abbas A, Lichtman A H, Pober J. Mc Graw – Hill Interamericana 2002.

Cada molécula FcεRI la componen 3 subunidades transmembranosas diferentes (Garman, 1998):

- Cadena  $\alpha$ : que permite la expresión del receptor en la superficie de la célula.
- Cadena  $\beta$ : que atraviesa 4 veces la membrana.
- Cadena  $\gamma$ : 2 cadenas homólogas a la cadena  $\xi$  del complejo receptor para el antígeno de las células T.

La porción extracelular amino terminal de la cadena  $\alpha$  contiene 2 dominios tipo Ig, que conforman el lugar de unión para la IgE y que es homólogo a los lugares de unión a la IgG de los receptores Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. En los humanos la expresión habitual del receptor es  $\alpha\gamma_2$ , sin la cadena  $\beta$  (Blank, 1989).

La cadena  $\beta$ , contiene un único lugar de activación del inmunoreceptor vía tirosina, en el extremo carboxi terminal citoplasmático, denominado ITAM. Las dos cadenas polipeptídicas  $\gamma$ , se encuentran unidas por puentes disulfuro y la porción citoplasmática de cada cadena  $\gamma$  contiene un ITAM. Esta cadena  $\gamma$ , sirve como subunidad común para los Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII (Kinet, 1988).

La expresión de receptores Fc $\epsilon$ RI, está regulada en mastocitos y basófilos por la IgE y la IL-4 en forma positiva (Paul y cols., 1993), lo que representa un mecanismo de amplificación de la respuesta inmunitaria en las infecciones parasitarias y en la hipersensibilidad inmediata.

Otro receptor de la IgE es el Fc $\epsilon$ RII; una proteína formada por una única cadena transmembranaria, relacionada con las lectinas de mamíferos de tipo C, cuya afinidad por la Ig E es 1.000 veces menor que el Fc $\epsilon$ RI. En la actualidad se han descrito 2 isoformas diferentes:

- Fc $\epsilon$ RIIA: específica de las células B.
- Fc $\epsilon$ RIIB ó CD23: cuya expresión es inducida en las células B, algunas células T, macrófagos, células dendríticas foliculares, células de Langerhans, plaquetas, monocitos y eosinófilos, por la IL-4.

En la actualidad las funciones del Fc $\epsilon$ RII estan relacionadas con la disminución de la respuesta a IgE (Yu y cols, 1994; Mudde y cols,1995)

### **1.2.5: Las células involucradas en la hipersensibilidad inmediata**

#### **1.2.5.1: Mastocitos**

Los mastocitos derivan de progenitores presentes en la médula ósea (Costa y cols., 1997), que a través de la circulación, migran a los tejidos periféricos, como células inmaduras y se diferencian “in situ”. Los mastocitos maduros se encuentran preferentemente cerca de los vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, por debajo del epitelio y también se encuentran presentes en los órganos linfoides. Microscópicamente tienen una variedad de formas, siendo común el núcleo redondeado y la presencia de gránulos citoplasmáticos, que contienen proteoglicanos ácidos, que se fijan a colorantes básicos, estando los mismos limitados por una membrana y cuerpos lipídicos.

Están en la actualidad descritas dos subpoblaciones de mastocitos (Irani y Clos, 1986; Weidner y Austen, 1990) , que se diferencian por:

- Localización anatómica.
- Contenido de los gránulos.

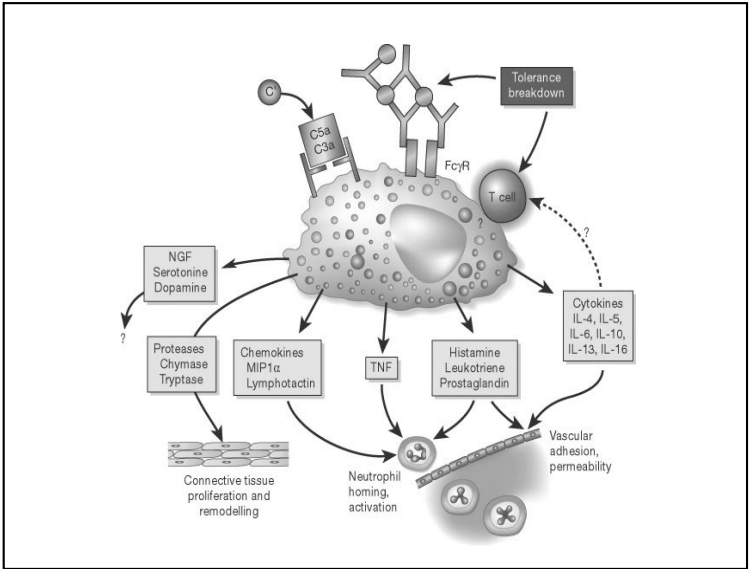
- Acciones de sus mediadores.

	Población 1	Población 2
Características	Tejido conjuntivo	Mucosos
Localización	Piel Submucosa intestinal	Espacios alveolos Mucosa intestinal
Dependencia en desarrollo del fenotipo de células T	No	Si
Contenido de los gránulos	Proteasas neutras: Tryptasa Quimasa Carboxipeptidasa Catepsina G	Proteasa mayor: Tryptasa

**Tabla 2: Subpoblaciones de mastocitos humanos**

Aunque no se conoce completamente el significado fisiopatológico de estas subpoblaciones (Galli y cols., 1999), es probable que los mastocitos mucosos estén implicados en las reacciones de hipersensibilidad inmediata dependiente de las células T y la IgE, con afectación de vías respiratorias, como el asma y que los mastocitos del tejido conjuntivo es probable que medien reacciones cutáneas papulo-eritematosas y procesos vasculares agudos, inducidos por estímulos no inmunológicos.

Los mastocitos también pueden activarse directamente por varias sustancias, como las anafilotoxinas derivadas del complemento y especialmente el C5a, que se unen a receptores específicos de los mastocitos y estimulan la degranulación de la subpoblación del tejido conectivo, pero no de la subpoblación pulmonar.



**Figura 6: liberación mediadores del mastocito**

### 1.2.5.2: Basófilos

Como otros granulocitos, los basófilos derivan de progenitores y maduran en la médula ósea, circulando en su forma diferenciada y representando menos del 1% del total de leucocitos sanguíneos circulantes y normalmente no se encuentran en tejidos. Al igual que los mastocitos, su citoplasma contiene gránulos, que fijan colorantes básicos y presentan la capacidad de síntesis de mediadores similares a los presentes en mastocitos.

Su rasgo más importante es el de expresar el receptor  $Fc\epsilon RI$  y su ulterior reclutamiento a los tejidos en los que esté presente el antígeno, puede contribuir al desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

La activación de ambos tipos celulares, mastocitos y basófilos, se realiza mediante el entrecruzamiento de moléculas de los  $Fc\epsilon RI$  (Baird, 1999); proceso que se induce mediante la unión de antígenos multivalentes a las moléculas de IgE fijadas a sus receptores. Efectivamente en los individuos no atópicos, la IgE asociada al mastocito o basófilo es específica para muchos antígenos diferentes y por lo tanto, es difícil que un antígeno aislado entrecruce suficientes moléculas de IgE para inducir la activación de la célula; mientras que en los atópicos ocurre una mayor probabilidad de entrecruzamiento entre moléculas de IgE.

Experimentalmente, la unión al antígeno puede reproducirse empleando anticuerpos anti  $Fc\epsilon RI$  ó anti IgE polivalentes. Los anticuerpos anti IgE, pueden entrecruzar moléculas de IgE, con independencia de la especificidad del antígeno y dar lugar a una activación comparable de los mastocitos o basófilos en individuos atópicos y no atópicos.

### 1.2.5.3: Bioquímica de la activación de mastocitos y basófilos

La activación de mastocitos y basófilos, conduce a tres tipos de respuesta biológica:

- Secreción del contenido de los gránulos citoplasmáticos, mediante un mecanismo de exocitosis.
- Síntesis y secreción de mediadores lipídicos.
- Síntesis y secreción de citoquinas.

El mecanismo de señalamiento en mastocitos (Metcalf y cols., 1997), es similar al que se desarrolla entre el antígeno y los linfocitos y se inicia, a partir del resto carboxi-terminal de la cadena  $\beta$  del receptor  $Fc\epsilon RI$ , que se encuentra constitutivamente asociado a la tirosina quinasa Lyn. Una vez producido el entrecruzamiento de las moléculas de  $Fc\epsilon RI$  por el antígeno, la tirosina quinasa Lyn fosforila los ITAM de los dominios citoplasmáticos de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del  $Fc\epsilon RI$ , para a continuación reclutar y activar la tirosina quinasa Syk, en los ITAM de la cadena  $\gamma$ , del  $Fc\epsilon RI$ . Uno de los sustratos de la tirosina quinasa Syk es la isoforma  $\gamma$  de la fosfolipasa C ( $PLC_\gamma$ ), específica del fosfatidilinositol, que cataliza la degradación del bifosfato de fosfatidilinositol en trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El trifosfato de inositol eleva



las concentraciones del calcio citoplasmático, que en combinación con el diacilglicerol activa la proteína quinasa C. La fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina por la proteína quinasa C activada, separa los complejos actina-miosina situados debajo de la membrana citoplasmática, permitiendo de éste modo que los gránulos entren en contacto con la membrana plasmática.

El entrecruzamiento de las moléculas de FcεRI por el antígeno, activa también la enzima adenilato ciclasa, por medio de una proteína heterotrimérica de unión al trifosfato de guanosina. La adenilato ciclasa activada, eleva los niveles del adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que activa la proteína quinasa A, la cual en forma activada es capaz de inhibir la degranulación y conforma un ciclo de retroalimentación.

La síntesis de los mediadores lipídicos está controlada por la activación del enzima citosólica fosfolipasa A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), que se produce bien por:

- Incremento del calcio citoplasmático.
- Fosforilación catalizada por proteína quinasa activada por mitógeno (MAP), como la quinasa activada por el receptor extracelular ERK.

Una vez activada la fosfolipasa A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), se hidrolizan los fosfolípidos de la membrana para liberar sustancias, que son convertidas por acción de cascadas enzimáticas en los mediadores definitivos. La producción de citoquinas por los mastocitos activados, es una consecuencia de la transcripción de genes de citoquinas, que han sido inducidos. Efectivamente, la activación de varias moléculas adaptadoras por la tirosina quinasa Syk induce la translocación nuclear de NFAT (factor nuclear de las células T activadas) y del NF-κB (factor de necrosis κ), así como la activación de AP-1, mediante proteína quinasas activadas por “stress”, como la quinasa N-terminal c-Jun. En conjunto ésta respuesta conduce a la transcripción de varias citoquinas como la IL-4, IL-6 y TNF, entre otras, pero no de la IL-2, al contrario que en las células T.

Otras sustancias, como las que se especifican en la tabla 3; pueden activar los mastocitos y basófilos, independientemente del descrito y derivado del entrecruzamiento de IgE, mediada por alérgenos. Esta forma directa de activación del mastocito, induce una respuesta de hipersensibilidad no mediada por IgE, que incluso puede amplificar la propia respuesta mediada por IgE.

DESCRIPCION	EJEMPLOS	MECANISMO
Compuestos polibásicos	48/80 y mastoparén	Activación proteínas G
Péptidos	mellitina	Homología C <sub>H4</sub> de la Ig E
Hormonas	corticotropina	Homología C <sub>H4</sub> de la Ig E
Neuropéptidos	sustancia P, somatostatina	Excitación inervación
Complemento y fragmentos	C5a (mastocitos piel)	Anafilotóxico

**Tabla 3: Activadores de mastocitos y basófilos directos****a) Mediadores de mastocitos y basófilos**

Los mediadores involucrados y denominados de la hipersensibilidad inmediata, pueden clasificarse en:

**a.1) Mediadores preformados:**

Se trata de aminas biógenas, enzimas y macromoléculas, que se encuentran almacenadas en sus gránulos citoplasmáticos. Las aminas biógenas son compuestos de bajo peso molecular y naturaleza no lipídica, que comparten la característica estructural de poseer un grupo amino.

En los mastocitos humanos (Abraham y Arock, 1998), el único mediador de ésta clase, presente en cantidades significativas es la histamina y en algunos roedores la serotonina puede llegar a tener la misma importancia que la histamina en los humanos. La histamina realiza su acción biológica mediante su unión a receptores específicos, presentes en las células diana y de los que se conocen en la actualidad 4 tipos, denominados como H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>. Tras su unión al receptor celular, se induce un señalamiento intracelular que conduce a la escisión del fosfatidilinositol en trifostato de inositol (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), induciendo distintos tipos de efectos en los diferentes tipos celulares diana. Su acción de corta duración, debido a su rápido metabolismo de arrastre del medio extracelular y sus principales efectos se especifican en la tabla 4.

CELULA DIANA	EFEECTO INDUCIDO
Endotelio	Contracción célula endotelial y extravasación vascular  Síntesis relajantes de musculatura lisa vascular (PGI <sub>2</sub> ) y óxido nítrico, que inducen vasodilatación
Músculo liso	Bronquios: broncoconstricción  Intestino: hipermotilidad

**Tabla 4: Principales efectos biológicos de la histamina**

Otro grupo de mediadores preformados de naturaleza proteica, lo integran las peptidasas pertenecientes a la clase de las serin proteasas neutras, entre los más abundantes, se encuentran la triptasa y la quimasa. La presencia de triptasa en fluidos biológicos, se asocia como un marcador de activación mastocitaria, dado que sólo ha podido demostrarse su presencia en éste tipo celular en los humanos. Su función biológica, demostrada exclusivamente “in vitro”, se encuentra en relación con la escisión del fibrinógeno y la activación de la colagenasa; lo que podría explicar su contribución a la lesión tisular. La quimasa, del mismo modo, es un marcador clásico de discriminación entre subpoblaciones mastocitarias humanas. Análogamente su función biológica, sólo demostrada “in vitro”, se encuentra en relación con la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, lo que podría relacionarse con la degradación de la membrana basal epidérmica y la estimulación de la secreción de moco. Otras enzimas presentes, como la carboxipeptidasa A y catepsina G.

El tercer grupo de mediadores preformados lo integran los proteoglicanos, moléculas que poseen un núcleo polipeptídico y múltiples cadenas laterales no ramificadas de glucosaminoglicanos, que confieren una fuerte electronegatividad a la molécula. Heparina y condroitin sulfato, son los más abundantes y su actividad está relacionada como matriz de almacenamiento de aminas biogénicas, enzimas y otras moléculas con carga positiva y su función se encuentra asociada a la regulación de la actividad de las serin proteasas almacenadas en los gránulos y por tanto de su accesibilidad al resto de la estructura celular.

#### **a.2) Mediadores de nueva síntesis:**

Se trata de mediadores lipídicos, sintetizados *de novo*, tras la activación de mastocitos y basófilos, de los cuales los de mayor importancia son los derivados del metabolismo del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa.

El principal mediador derivado del ácido araquidónico, inducido por la acción de la ciclooxigenasa de los mastocitos es la prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>); la cual actúa mediante su unión a receptores específicos presentes en las células musculares lisas, ejerciendo una acción broncoconstrictora y vasodilatadora, así como quimiotractante para los neutrófilos, que se acumulan en el foco de la inflamación. Su síntesis puede ser bloqueada mediante inhibidores de la ciclooxigenasa, como el ácido acetilsalicílico y los antiinflamatorios no esteroideos.

Los mediadores derivados del ácido araquidónico, inducidos por la vía de la lipooxigenasa en mastocitos y basófilos son los leucotrienos y especialmente el LTC<sub>4</sub> y sus productos de degradación LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. El LTC<sub>4</sub>, es sintetizado por mastocitos mucosos y basófilos, pero no por los mastocitos del tejido conjuntivo. Este tipo de leucotrienos presentan receptores específicos en las células de la musculatura lisa, induciendo una broncoconstricción prolongada (McFadden y Gilbert, 1992). Cuando éste tipo de leucotrienos se inyecta en piel, inducen una reacción pápulo-eritematosa de larga duración muy característica, que corresponde al efecto biológico de la

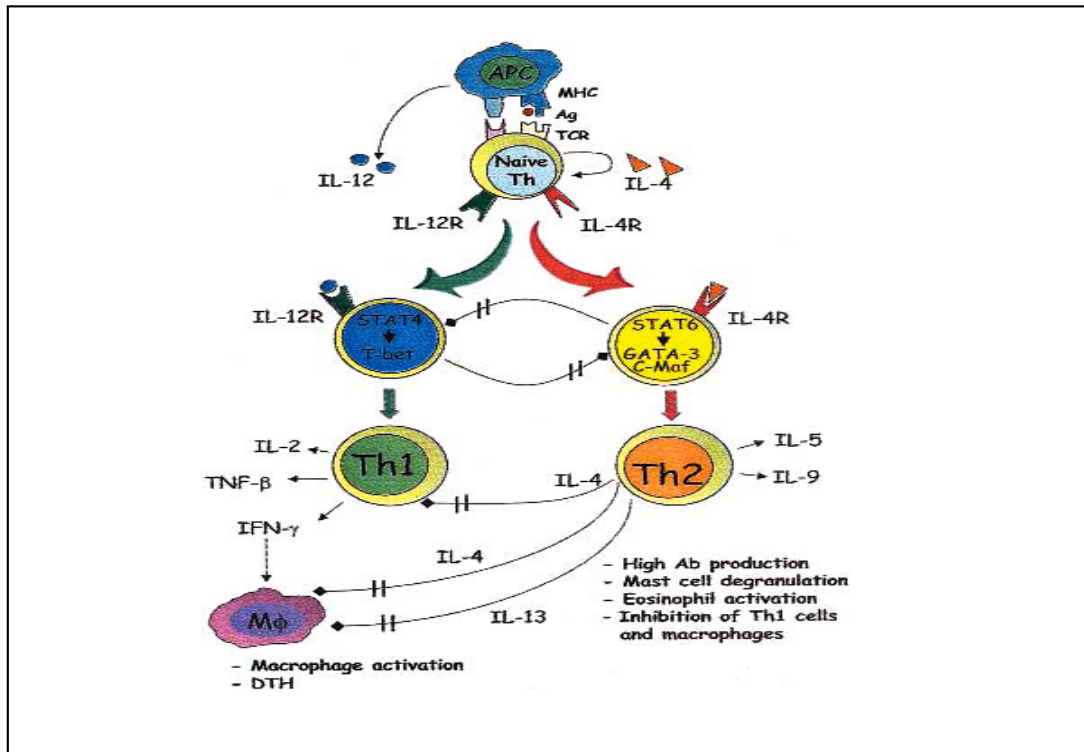
que antiguamente se denominaba como SRS – A (slow reacting substance of anaphylaxis) y que en la actualidad se ha demostrado que corresponde al conjunto LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>; principal mediador de la broncoconstricción asmática.

La posible razón de la exacerbación de la broncoconstricción inducida por antiinflamatorios no esteroideos, pudiera deberse a la desviación del metabolismo del ácido araquidónico hacia la vía de 5-lipooxigenasa, al resultar inhibida la vía de la ciclooxigenasa; lo cual incrementaría la producción de leucotrienos.

Un último apartado de los principales mediadores lipídicos, producidos por los mastocitos, es el denominado factor activador de las plaquetas (PAF); que debe su nombre a su característica inicialmente descrita, de inducir la agregación plaquetaria en el conejo. El PAF en los mastocitos y basófilos, se sintetiza a partir de la acilación del lisogliceril éter de fosforilcolina; un derivado de la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, mediado por la actuación del enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Sus principales efectos biológicos son la broncoconstricción directa y la retracción de las células del endotelio, que conduce a la relajación de la musculatura lisa vascular, así como también la acumulación de leucocitos inflamatorios. Su mecanismo de acción está relacionado con la activación de la vía de ciclooxigenasa II (inducible) y su consiguiente mecanismo de retroalimentación. La elevada característica hidrofóbica del PAF, le confiere una elevada metabolización a partir del enzima plasmático PAF acetil hidrolasa. La principal fuente de producción de PAF parece asignarse a los basófilos, así como también a las células del endotelio vascular, que lo liberan una vez que se haya producido su estimulación, por la histamina o los leucotrienos.

### **a.3) Citoquinas:**

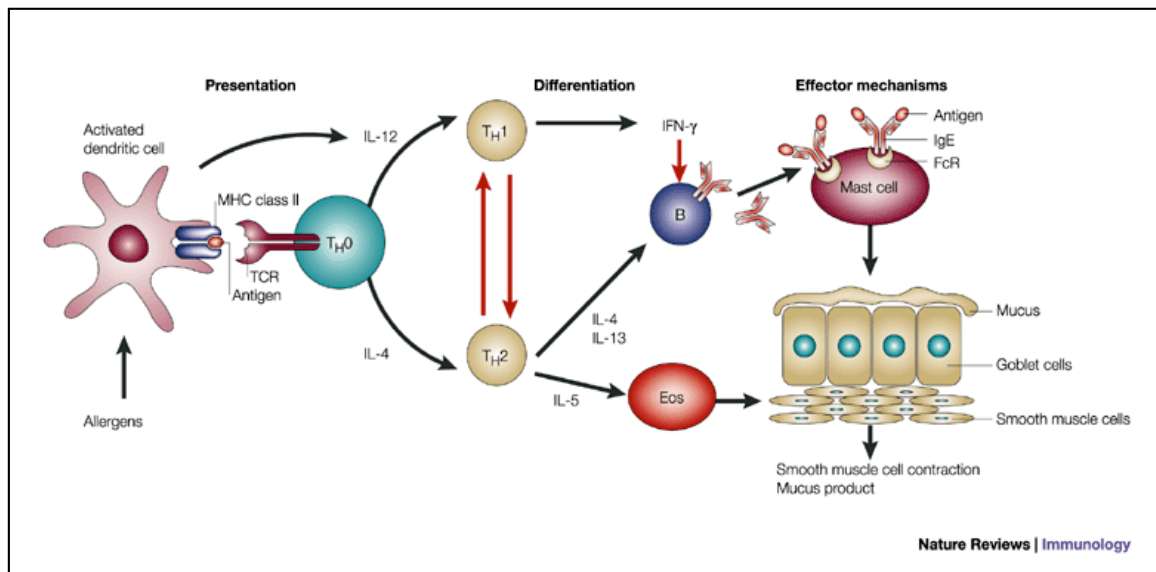
La producción de citoquinas por mastocitos y basófilos contribuye al fenómeno inflamatorio, característico de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. Entre las citoquinas preformadas, la más importante es el denominado factor de necrosis tumoral (TNF -  $\alpha$ ); que es liberado inmediatamente de los gránulos tras el entrecruzamiento de los Fc $\epsilon$ RI y cuyos efectos biológicos más importantes son la activación de la expresión endotelial de las moléculas de adhesión, responsables de los infiltrados secuenciales de células polimorfonucleares y mononucleares; así como el reclutamiento de subpoblaciones T<sub>H</sub>2 que conducen a la generación de la denominada fase tardía de las reacciones de hipersensibilidad, a la que se suman las citoquinas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP - 1 $\alpha$  y MIP - 1  $\beta$ , GM - CSF; que son sintetizadas “de novo”, tras la activación de mastocitos y basófilos (Yazdanbakhsh y cols., 2002).



**Figura 7: Liberación interleuquinas. Mecanismos de regulación**  
(Romagnani, 2004)

#### 1.2.5.4: Eosinófilos

Este tipo celular, abundante en los infiltrados inflamatorios de fase tardía, tiene su origen en la médula ósea y tras su maduración a partir de sus precursores mieloides, circula en sangre diferenciándose por la acción del GM-CSF y las IL-3 e IL-5 (Ying, 1997). Su presencia es normal en los tejidos periféricos y en especial en los revestimientos mucosos de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario. Su activación y reclutamiento hacia las zonas de inflamación en las reacciones de fase tardía, es mediada por las citoquinas producidas por las subpoblaciones  $T_H2$  (Constant y cols., 2000); lo cual contrasta con las reacciones de hipersensibilidad retardada o celular, que está mediada por la subpoblación  $T_H1$  y en las que intervienen la activación de los macrófagos. La presencia de macrófagos en los infiltrados inflamatorios y los tipos celulares  $T_H1$  y  $T_H2$  constituyen la principal diferencia entre ambos tipos de inflamación.



**Figura 8: Fase tardía. Liberación mediadores** (Marsha Wills-Karp, 2001)

La activación de los eosinófilos, depende fundamentalmente de las mismas citoquinas que intervienen en su maduración y fundamentalmente de la IL-5; que los transforma a una forma hipodensa y de un tamaño incrementado, con respecto a su forma habitual. Su reclutamiento e infiltración en las células endoteliales, viene definido por la expresión en las mismas de la selectina - E, a la cual se unen, al igual que los neutrófilos. El factor diferenciador entre ambos tipos celulares es la expresión por parte de los eosinófilos del ligando VLA - 4 (CD49dCD29) que se adhiere a las células vasculares que expresan la molécula de adhesión VCAM - 1. La IL-4, es capaz de inducir la expresión de la molécula de adhesión VCAM - 1 en las células del endotelio, sin inducir la expresión de la selectina - E.

Otros factores de activación, que intervienen en el reclutamiento y la infiltración, son las quimoquinas, como la eotaxina, la proteína quimiotáctica de los monocitos 5, el C5a y los mediadores lipídicos PAF y LTB<sub>4</sub>; así mismo ha sido demostrada la existencia de factores potenciadores, como es el caso de la IL-5, que incrementa la respuesta de los eosinófilos a la eotaxina.

Los eosinófilos expresan receptores de Fc para la Ig G, Ig A e Ig E; aún cuando no parecen ser sensibles a la activación por entrecruzamiento entre receptores, mediada por el antígeno, a diferencia de lo que hemos significado en los mastocitos y basófilos (Kinet, 1999). Sus gránulos contienen hidrolasas lisosómicas, como la peroxidasa que cataliza la producción de ácido hipocloroso y proteínas específicas, como la catiónica (ECP) y la proteína principal básica (BPP). Estas son especialmente tóxicas para los helmintos y bacterias, así como para los tejidos circundantes.

En su forma activada, los eosinófilos, producen y liberan mediadores lipídicos con propiedades antiinflamatorias, muchos de los cuales poseen propiedades vasoactivas que incrementan los efectos biológicos de los mediadores producidos por los mastocitos y basófilos. En particular la producción de éste tipo de mediadores es por vía de la 5 y 15 lipooxigenasa, que conduce a la producción del LTC<sub>4</sub> y sus derivados LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, potentes

estimuladores de la actividad vasomotora, bronconstricción y secreción de moco. Se ha descrito la producción de PAF y citoquinas, como la IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES y eotaxina, aún cuando no se conoce su significación biológica (Wardlaw y cols., 1995).

### **1.3 Alérgenos. Origen y obtención**

La mayoría de los alérgenos son proteínas o glicoproteínas con una masa molecular de 5 a 100 kDa, y con puntos isoelectricos acídicos que no se distinguen especialmente de otras moléculas proteicas. Sin embargo, existen una serie de características que pueden favorecer que una proteína o sustancia en general actúe como alérgeno: capacidad para alcanzar el sistema inmune, complejidad molecular, concentración, solubilidad, extrañeza del organismo, estabilidad, características bioquímicas y función biológica, entre otras. También pueden actuar como alérgenos, hidratos de carbono y componentes de bajo peso molecular que por su fuerte reactividad se conjugan con proteínas del huésped y actúan como haptenos. Los alérgenos también pueden aparecer como resultado de la interacción y metabolismo de un fármaco. (Holgate, 1993).

La sensibilización a un alérgeno no solo depende de sus características intrínsecas, sino también de su presencia conjunta con factores ambientales, que actúan sumatoriamente, no sólo como irritantes, sino también como potenciadores y que han sido en muchos casos adecuadamente identificados, como vapores y humos de compuestos químicos (p.e. formaldehído), la polución atmosférica (p.e. las partículas diesel) o factores ligados a la inmunidad del individuo como predisposición genética, infecciones, inmunodepresiones debidas a patologías o tratamientos médicos, situaciones de estrés, etc. Las fuentes más complejas de alérgenos son el polen, los hongos y los ácaros, de los que de un 20% a un 60% de sus proteínas son alergenicas. Otros alérgenos menos complejos son epitelios de animales, orinas, etc. (Holgate, 1993)

### **1.4 Diagnostico e Inmunoterapia en alergia**

En el diagnostico clínico y etiológico, los extractos alergenicos son utilizados como herramienta indispensable para comprobar, tras la exposición del paciente a la fuente alérgica, la reacción inducida y que se manifiesta por la aparición de los síntomas o signos clínicos (pruebas in vivo), o para detectar con dicho extracto, la unión de anticuerpos IgE alérgeno específicos en el suero del paciente (pruebas in vitro).

La inmunoterapia con alérgenos, consiste en la administración de cantidades progresivamente crecientes del alérgeno involucrado e identificado como causante primario de la sensibilización del paciente. El tratamiento modifica la respuesta inmunológica de la hipersensibilidad, restaurando la respuesta normal y conduciendo por tanto a una reducción de respuesta alérgica mediada por IgE. Esta técnica, con más de un siglo de vigor, fué descrita por primera vez por Noon en 1911.

La vía más frecuentemente utilizada en inmunoterapia, es la que implica repetidas inyecciones por vía subcutánea de dosis crecientes de extractos alergenicos unidos a adyuvantes (Bousquet, 1998). Numerosos

estudios clínicos han documentado la eficacia de la inmunoterapia, pero los mecanismos inmunológicos que sostienen tales pruebas son todavía objeto de controversia (Bousquet, 1998). En la siguiente tabla podemos observar los más ampliamente demostrados.

Proceso	Mecanismo
Reacciones inmediatas	
Reacciones inmediatas cutáneas (Degranulación mastocitos)	Bloqueo IgG, competición IgE
Degranulación basófilos	Bloqueo IgG, competición IgE
Numero mastocitos	Reducción por mecanismo desconocido
Liberación de mediadores de mastocitos y basófilos	Incremento de IL-10 y IFN $\gamma$
Reacciones tardías	
Presentación del alérgeno a las Celulas T, activación y liberación de citoquinas	Bloqueo IgG, competición IgE
Proliferación células T	Generación de células supresoras Tolerancia células T
Producción citoquinas Th2	Reducción de IL-4 e IL-13 de las células T
Producción citoquinas Th1	Inducción de células Th1
Numero de eosinófilos	Reducción de IL-5

**Tabla 5: Eficacia de la inmunoterapia. Procesos y mecanismos inmunológicos.** (Valenta, 2002)

En 1935, más de 30 años antes del descubrimiento de la IgE, Robert A. Cooke documentó la primera experiencia acerca de los mecanismos de inmunoterapia inyectada: la transfusión de sangre de un paciente tratado con inmunoterapia a un paciente que padecía fiebre de heno, le proporcionó una mejoría considerable. Años más tarde, se determinó que el factor transferido a través de la sangre era la inmunoglobulina IgG, que tenía la capacidad de inhibir las reacciones inmediatas que eran provocadas por el alérgeno causal. (Cooke, 1935) Este hecho hizo que dicha inmunoglobulina fuese definida como una inmunoglobulina bloqueadora (Loveless, 1940), término que aún hoy en la actualidad mantiene su vigor científico y valor crítico relacionado con la eficacia de la inmunoterapia

Estudios posteriores mostraron que las inmunoglobulinas IgG (IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub>) (Ball, 1999) competían con la IgE por los sitios de unión con los alérgenos, por lo que se prevenía en primer lugar la activación de los basófilos y la liberación de mediadores biológicos (Ball, 1999), y en segundo lugar se inhibía la presentación de alérgenos IgE mediados a las células T,



reduciéndose la activación de las células Th2 y por consiguiente la liberación de citoquinas Th2 dependientes (Van Neerven, 1999).

Posteriormente se reveló la importancia del papel que juegan las células T en la inmunoterapia (Rocklin, 1980): la generación de células T supresoras durante la misma, la observación de la disminución en la producción de IL-4 por las células T CD4<sup>+</sup>, así como la descripción del cambio en el patrón de respuesta Th2 a Th1 ponen de manifiesto uno de los mecanismos que más referencias ha generado sobre el modo de acción de la inmunoterapia (McHugh, 1995).

La adsorción de los extractos alergenicos sobre formulas adyuvantes permite disminuir las dosis a administrar, así como un incremento de la inmunogenicidad de la misma, y las modificaciones químicas de los extractos alergenicos como el tratamiento con glutaraldehido reducen su actividad alergénica (Bousquet y cols., 1998).

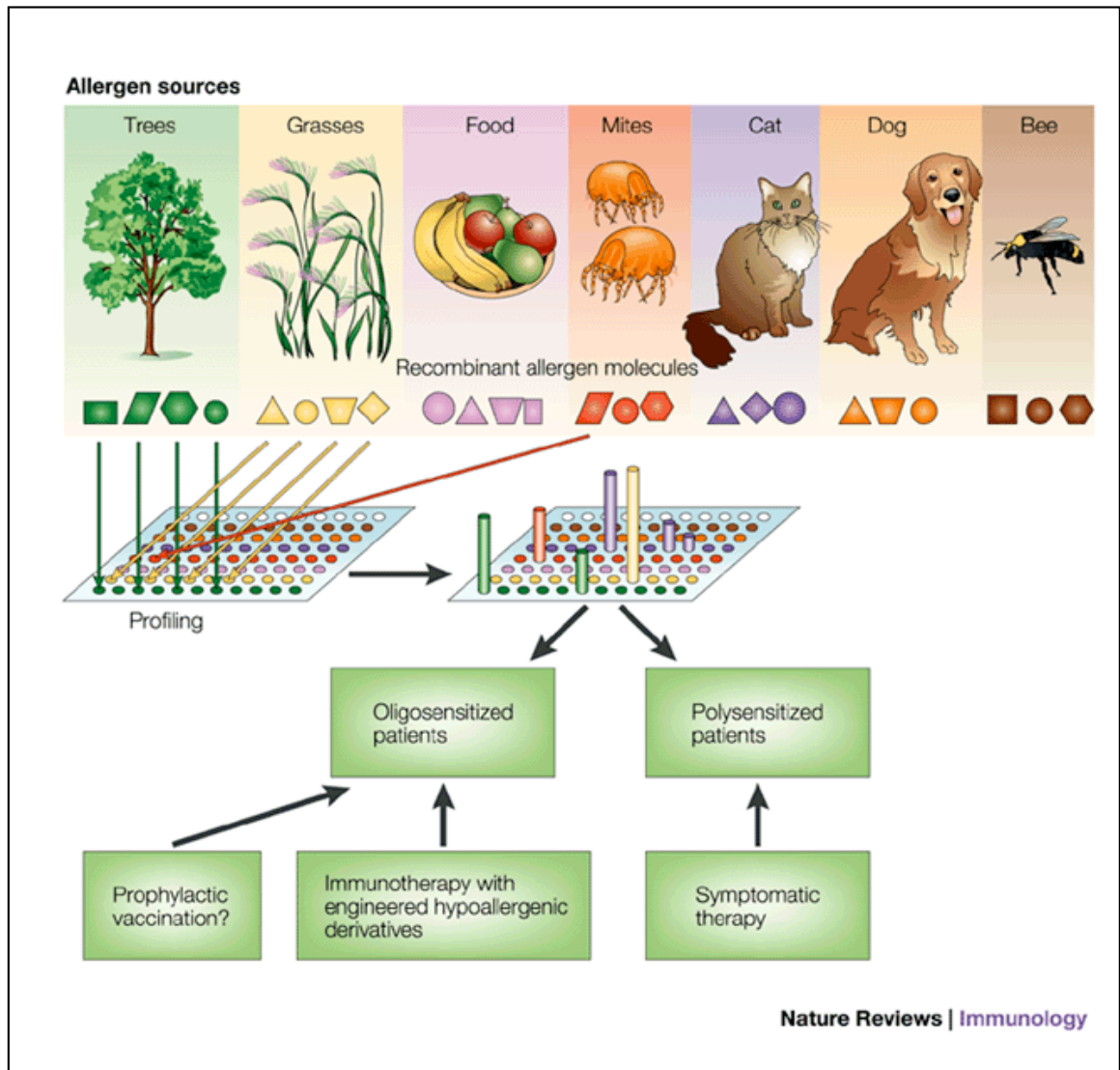
Concluyendo, los extractos alergenicos se obtienen a partir de sus fuentes naturales y están compuestos por una mezcla de múltiples proteínas (van Ree, 1996). De entre estas, sólo algunas son alérgicas: aquellas a las que está sensibilizada la mayor parte de la población de alérgicos, son los llamados alérgenos mayores. El uso de extractos completos para el diagnóstico y tratamiento, con proteínas a las que el paciente no es alérgico, encierra el riesgo de sensibilizarle a alguna de ellas (Bousquet y cols., 1998). Dependiendo de su estructura podrían causar una reactividad cruzada con otras fuentes alergenicas, tal es el caso de las profilinas (Valenta, 1991) y que por tanto, constituyen una fuente de error sistemático en la interpretación de pruebas diagnósticas. Por ello, el uso de alérgenos purificados debe considerarse para uso clínico diagnóstico y terapéutico, en vías a poder definir el alérgeno primario sensibilizante.

En la década pasada, han sido multiples las investigaciones que han estado dirigidas a la obtención mediante tecnología recombinante, de los alérgenos presentes en las fuentes alérgicas y que expresan una mayor relevancia clínica (Hiller, 2002). Los alérgenos recombinantes, en función de sus peculiares estructuras y actividad, son expresados en diferentes vectores y deben ser comparados con las formas nativas de los mismos, con objeto de tratar de llegar a la homogeneidad biológica entre las formas.

Estos hallazgos han abierto un campo novedoso y lleno de posibilidades en Alergología, tanto en investigación básica como en aplicación clínica: permite el estudio de reactividad cruzada entre alérgenos y caracterizar extractos de diagnóstico y tratamiento de manera más exacta y por tanto absolutamente estable entre lotes y diferentes fuentes alérgicas, lo que permite avanzar en la precisión de las dosis óptimas de tratamiento. Se identifican también nuevos alérgenos de importancia clínica.

En ésta memoria se ha ensayado indirectamente con distintos recombinantes en forma de inmunógenos para generar anticuerpos de captura y de una forma directa, en la actualidad se están ensayando técnicas que permitan definir, de un modo rápido y cualitativo cuales de los alérgenos presentes en un extracto alergenico son los causantes de las manifestaciones

clínicas y cuales serían los alérgenos primarios implicados en la sensibilización mediante la aplicación de los llamados “microarrays”, herramientas poderosas capaces de detectar un elevado numero de posibles agentes causantes de alergia y que utilizan cantidades muy pequeñas de material biológico, sin complicaciones tecnológicas y de forma rapida (figura 9).



**Figura 9: Paneles con alérgenos para ensayos microarrays** (Hiller, 2002)

## 2. LOS ACAROS

### 2.1 Biología de los ácaros:

Los ácaros son artrópodos quelicerados y por tanto presentan como característica, la división longitudinal de su cuerpo en segmentos o metámeros con dos apéndices articulados o patas en cada lado. El agrupamiento de los segmentos que forman el cuerpo en regiones o tagmas, le confiere funciones diferentes en relación con la locomoción, capacidad sensorial, alimentación y reproducción entre otras. Su cuerpo, revestido de una cutícula rígida e inextensible y formado por quitina, conforma su exoesqueleto y no permite su crecimiento, lo que le obliga a desprenderse del mismo y generar uno nuevo según su desarrollo. Las principales diferencias de los ácaros con respecto al resto de los artrópodos (crustáceos, miriápodos e insectos), son la ausencia de antenas y mandíbulas, disponer de quelíceros como primer par de apéndices y tener el cuerpo dividido en dos tagmas: prosoma ó cefalotorax y opistosoma ó abdome.

Los ácaros domésticos miden alrededor de los 400 nm y pertenecen generalmente a la familia Pyroglyphidae. Se alimentan de los restos de piel que perdemos, aproximadamente 2 g/día, lo que condiciona su habitat a los lugares de mayor permanencia del ser humano. Los factores físicos que condicionan su supervivencia como la temperatura, se muestra óptima entre los 25 y 30° C y la humedad relativa alrededor del 75%, les permite una longevidad más elevada a las hembras que a lo machos, que en el caso de la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*, se cifra en el entorno 60 – 80 días y de 100 a 150 días respectivamente.

El desarrollo de huevo a adulto en la Familia Pyroglyphidae se estima comprendido en los 30 días, llegándose a producirse hasta dos fecundaciones en la primera mitad de la vida de la hembra y que conduce a una puesta de huevos por fecundación de 40 a 120 según la especie y que pasan en 6 días a larvas y ulteriormente en periodos de 1 semana cada una, pasan de protoninfa a tritoninfa y ulteriormente a la forma adulta (Barnes, R A 1990)

El polvo doméstico como causa de las enfermedades alérgicas históricamente ha sido descrito por Kern en 1921, Cooke en 1922 y Store van Leeuwen en 1922. Sin embargo los ácaros, como presunta fuente de sensibilización del polvo doméstico no fueron identificados y clasificados hasta 1964 por Voorhorst y Spiekma (Voorhorst, M 1969). A partir de entonces se han realizado gran cantidad de trabajos que muestran diferentes especies con actividad alergénica atribuible a la presencia de ácaros de las familias Pyroglyphidae (Géneros *Dermatophagoides*: *D. pteronyssinus* y *D. farinae* y Euroglyphus: *E. maynei*), Glyciphagidae (Géneros *Blomia*: *B. tropicalis* y *Lepidoglyphus*: *L. destructor*) y Acaridae (Géneros *Acarus*: *A. siro* y *Tyrophagus*: *T. putrescentiae*). (Internacional Workshop Report. 1989)

### 2.2 Taxonomía:

Existen más de 30.000 especies de ácaros, de los que los principalmente involucrados en la sensibilización alérgica al polvo doméstico se representan en la tabla 6 que se especifica a continuación. Los estudios de prevalencia muestran que la especie *Dermatophagoides pteronyssinus* es más

relevante en Europa y la especie *Dermatophagoides farinae* es predominante en América. De ahí precisamente que sean reconocidos como los ácaros europeo y americano respectivamente.

Superfamilias	Familias	Subfamilias	Géneros	Especies
Glycyphagidae	Echimyopodidae	Glycyphaginae	Blomia	<i>B. tropicalis</i> <i>B. kulagini</i>
	Glycyphagidae		Glycyphagus Lepidoglyphus	<i>G. domesticus</i> <i>L. destructor</i>
	Chortoglyphidae		Chortoglyphus	<i>C. arcuatus</i>
Acaroidea	Acaridae		Acarus Aleuroglyphus Tyrophagus	<i>A. siro</i> <i>A. ovatus</i> <i>T. putrescentiae</i>
	Suidasiidae		Suidasia	<i>S. medanensis</i> <i>S. reticulata</i>
Analgoidea	Pyroglyphidae	Pyroglyphinae  Dermatophagoidae	Euroglyphus  Dermatophagoides	<i>E. maynei</i>  <i>D. pteronyssinus</i> <i>D. farinae</i> <i>D. microceras</i> <i>D. siboney</i>

**Tabla 6: Clasificación taxonómica de los principales ácaros domésticos**

### 3. Los ácaros como alérgenos

#### 3.1 Carácter neuromoalérgico de los ácaros del polvo doméstico

El polvo doméstico es la principal fuente de alérgenos de los que se conocen como alérgenos de interior. Se compone tanto de materia inorgánica, como orgánica e incluye una gran cantidad, cualitativa y cuantitativa de bacterias, hongos, esporas, restos de insectos, pólenes, fibras vegetales y restos de epitelios de mamíferos. Las dos justificaciones principales que concluyeron la definición de los ácaros como principal fuente alérgica del polvo doméstico, se resumen en:

- Correlación entre la potencia alérgica de los extractos de polvo y la presencia del número de ácaros presentes en las muestras de polvo.

- Correlación entre la reactividad cutánea a los extractos de polvo y la que expresaba el extracto obtenido a partir de ácaros cultivados.

Las actuales construcciones, priman la disminución de la renovación del volumen de aire y condicionan incrementos importantes del grado de contaminación en las mismas, lo que sumado a que los individuos de los países industrializados pasen más del 90% de su tiempo en espacios cerrados de estas características, conduce a un incremento de las enfermedades alérgicas (Blumenthal M, 1995).

Los alérgenos son definidos como antígenos que inducen una respuesta mediada por IgE. La inhalación de alérgenos de ácaros, es causa de broncoconstricción y sibilancias en los pacientes sensibilizados y constituyen la principal fuente alérgica del polvo doméstico. La exposición a otras fuentes alérgicas del polvo doméstico, como cucarachas, derivados epidérmicos de gato y hongos como *Alternaria alternata*, representan también factores de riesgo en la exacerbación del asma (Platts-Mills TAE, 1997).

La principal fuente alérgica de los ácaros del polvo doméstico se encuentra en sus partículas fecales, dado que más de las dos terceras partes del mismo representan su aparato digestivo y es precisamente su intestino, el lugar de procesamiento alérgico más importante. Estas partículas presentan una forma esférica y un diámetro entre los 10 y los 40  $\mu$ m, lo que al igual que acontece con el polen, le confiere un carácter anemófilo y permite su suspensión y transporte por el aire (Tovey E R, 1982). Estructuralmente las partículas consisten en diminutas bolas de 3 – 5 unidades, unidas entre sí por un moco y englobadas en una membrana semipermeable. Un ácaro puede excretar por encima de las 40 partículas fecales por día.

La predisposición genética como condicionante fundamental en la susceptibilidad a desarrollar una ulterior sensibilidad alérgica, es de una importancia elevada y por ello, la minimización de la carga alérgica en población infantil (Arshard S, 1992), cuando uno de los progenitores es alérgico debe de ser considerada, máxime en el caso de los ácaros del polvo doméstico y no sólo en su apartado preventivo, sino también cuando se produce el debut e instaura la patología alérgica en el paciente (Kuehr J, 1994).

### **3.2 Diagnóstico de la sensibilidad a ácaros:**

El diagnóstico de sensibilización a los ácaros del polvo doméstico se demuestra de forma simple mediante la historia clínica, las pruebas cutáneas y la demostración de IgE específica en el suero de los pacientes. Sin embargo el término sensibilidad, no se corresponde con el de alergia, dado que éste último implica la aparición de síntomas clínicos.

La determinación de IgE específica en suero de pacientes con clínica de sensibilización a polvo doméstico, muestran que existe en más del 80% un reconocimiento de alérgenos de ácaros y que la actividad biológica remanente del suero se debe a alérgenos de derivados epidérmicos de gato y perro (Aalberse RC. 1975).

La mayor parte de los pacientes alérgicos a ácaros, muestran una sensibilidad multiespecie, mayoritariamente a nivel de rango de familia (Johansson E. 1997). Esta multisensibilidad debida al fenómeno conocido de reactividad cruzada, a causa de que comparten determinantes alergénicos comunes, se muestra más estrecha entre las especies de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*. La reactividad cruzada de los ácaros con otros invertebrados, también se ha estudiado, habiéndose comprobado la coexistencia con sensibilidades a cucaracha y chiromónidos, sin una aparente significatividad o relevancia clínica, así como a otros invertebrados como camarones (Wittelman A M. 1994).

La especie *Dermatophagoides pteronyssinus* muestra al menos 20 alérgenos de diferente frecuencia e intensidad en el reconocimiento por la IgE del suero de pacientes atópicos (Baldo. 1989). Estudios en población seleccionada por su reactividad a *Dermatophagoides farinae*, sobre los que se ensayó la frecuencia de reconocimiento de la IgE específica, mostraron coeficientes de correlación de 0.954 (n=79) para el denominado Grupo 1, de 0.084 (n=82) para el denominado Grupo 2, 0.405 (n= 52) para el denominado Grupo 3 y 0.796 (n=36) para el denominado Grupo 5 de los alérgenos de ácaros, que corresponden a los alérgenos de mayor importancia y que concluyen que los Grupos 1 y 2 parecen ser los de mayor importancia en los ácaros (Aalberse R C. 1998).

#### 4. Alérgenos de ácaros:

Los alérgenos de los ácaros originalmente se clasificaron de acuerdo con la normativa de identificación preconizada por la WHO International Union of Immunological Societies in Allergen Nomenclature (King T P in WHO:IUIS. 1994). Según se especifica en la misma, los alérgenos fueron clasificados en función de indicar las tres primeras letras del género, seguidas de la primera letra de la especie y ulteriormente un número ordinal identificativo del orden de purificación del mismo.

Así por ejemplo la especie de *Dermatophagoides pteronyssinus* exhibiría para identificar su alergograma el alérgeno Der p 1, el alérgeno Der p 2, ...Der p n.

En la actualidad, aún cuando se sigue manteniendo ésta nomenclatura, en la actualidad se considera más efectivo que sean clasificados grupalmente en forma de Grupo 1, Grupo2,...etc, dado, el incremento en el número de alérgenos aislados, así como el elevado conocimiento de las características de los alérgenos purificados, como secuencia, grado de homología, actividad biológica, relevancia clínica ... etc; Se toma como base de ésta clasificación la descripción concreta de su función biológica.

La figura 10 expresa los alérgenos más importantes identificados en los principales ácaros implicados en la sensibilidad al polvo doméstico y en la que son consideradas las características físico-químicas más relevantes de los grupos alergénicos, así como de los alérgenos individualizados. También se considera en la tabla la relevancia clínica de los mismos, en base a los estudios de prevalencia de la fijación de IgE y la existencia de las reactividades cruzadas inter e intrafamilias de las diferentes especies de ácaros descritas

como sensibilizantes, así como de los distintos alérgenos que componen su actual y conocido alergograma.

**GRUPOS DE ALERGENOS DEFINIDOS: ACAROS**

GR	P.M.	PREVAL.	ACTIVIDAD	PYROGLYPHIDAE	GLYPHAGIDAE	ACARIDAE
1	25	>70%	cistein proteasa	Der p - f - m 1, Eur m 1	Blot t 1	
2	14	>70%	epididimal	Der p - f 2, Eur m 2	Gly d - Lep d 2	Tyr p 2
3	30	>50%	tripsina	Der p - f 3, Eur m 3		
4	56	<50%	amilasa	Der p - f 4, Eur m 4		
5	18	<50%	???	Der p 5	Blot t-Lep d 5	
6	26	<50%	quimotripsina	Der p - f 6		
7	22	<50%	???	Der p - f 7	Lep d 7	
8	26	<50%	glutat transferasa	Der p 8		
9	24	>70%	serin proteasa	Der p 9		
10	33	<50%	tropomiosina	Der p - f 10	Blot t-Lep d 10	
11	98	<50%	paramiosina	Der p - f 11	Blot t 11	
12	14	<50%	???		Blot t 12	
13	15	<50%	unión ác. grasos	Der spp (farine, siboney)	Blot t-Lep d 13	Aca s-Tyrp13
14	189	<50%	apolipoforina	Der p - f 14, Eur m 14		
15	98	<50%	quitinasa	Der f 15		
16	53	<50%	gelsolina (Ca 2+)	Der f 16		
17	53	<50%	Ca2+ EF	Der f 17		
18	60	<50%	quitinasa	Der f 18		
19	7	<50%	antimicrobiano	Der f 19	Blot t 19	

Acc V Spot Magn Det WD P 20.0kV 4.0mm 519x SE 11.4 L destructor 50 µm

**Figura 10: Principales alérgenos ácaros**

#### **4.1 *Dermatophagoides pteronyssinus***

El ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* representa una de las fuentes alérgicas mejor estudiadas. Sus principales alérgenos se especifican a continuación:

##### **I) Alérgenos con actividad enzimática:**

##### **Grupo 1: Cisteín proteasas**

##### **Der p 1 y análogos**

Se trata de una glicoproteína de 25 kDa de peso molecular, termolábil (se inactiva a 80°C), con pI ácido en un rango entre 5.8 y 7.5, con habitualmente presencia de isoformas o variantes polimórficas y que presenta una actividad enzimática cisteín-proteasa, con una secuencia que presenta una cierta homología con otras proteasas como papaina, actinidina, catepsinas H y B, enzimas con un residuo de cisteína en su centro activo (Chua K Y. 1988). Contiene 7 residuos de cisteína que conforman 3 puentes disulfuro. Su función biológica se encuentra asociada con los procesos digestivos y es secretado en el intestino del ácaro, participando con otras



enzimas en los procesos de degradación de la digestión de acuerdo con su actividad proteolítica.

Su síntesis parte de una forma enzimáticamente inactiva, tal y como ocurre con otras enzimas digestivas, su inactivación se encuentra mediada por un residuo de 80 aminoácidos que engloba su centro activo y que ulteriormente es secretada sin el propéptido, al canal alimentario en su forma enzimática madura. Su actividad cistein proteasa, le permite separar el receptor de baja afinidad de la IgE (CD23) de la superficie de los linfocitos B humanos, receptor presente así mismo en eosinófilos, células dendríticas foliculares, macrófagos y plaquetas; lo que conlleva a inducir un incremento de la síntesis de IgE a través del CD23 soluble y sus fragmentos (Schulz. 1995). También presenta una acción separadora de la subunidad  $\alpha$  del receptor de la IL-2 (IL-2R ó CD25) de la superficie de las células T periféricas humanas, lo que potencia la respuesta de tipo Th2, incrementando la producción de la IL-4 y disminuyendo la secreción de IFN- $\gamma$  y la capacidad de propagación de células Th1 (Schulz. 1998). Esta actividad proteolítica del Der p 1 se extiende a la  $\alpha_1$  antitripsina, una serin proteasa inhibidor y protectora natural de la mucosa bronquial del posible daño proteolítico inducido en los procesos inflamatorios por la liberación de IL-6, IL-8 y GM-CSF, citoquinas proinflamatorias que actúan incrementando la permeabilidad vascular y favoreciendo el transvase y exposición a macromoléculas y alérgenos (King. 1998).

El gen que codifica para Der p 1 fue el primero de los genes clonado y secuenciado de un alérgeno mayor (Chua. 1988), lo que ha permitido aplicando la tecnología de cDNA, su fragmentación y múltiples estudios en relación con la alergenidad de Der p 1. Por ejemplo conocemos que dispone de 5 epitopos B, de los que 3 comparte con Der f 1 (Green. 1990). Los alérgenos del Grupo 1 de ácaros del género *Dermatophagoides*, realizados en las especies *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *D. microceras* y *D. siboney* muestran una homología en su estructura primaria superior al 80% (Dilworth. 1991 y Ferrandiz 1995) y una frecuencia de reconocimiento entre el 80 y 90%. Los ensayos realizados con alérgenos del Grupo 1 de otras especies como Blo t 1 de *Blomia tropicalis*, muestran un 35% de homología con Der p 1 y Der f 1 y más de un 60% de unión a IgE (Mora C. 2003). Finalmente el alérgeno Eur m 1 de la especie *Euroglyphus mainey*, presenta una homología superior al 85% con Der p 1 y Der f 1 (Kent. 1992).

En la actualidad una de las principales vías de investigación que involucran el alérgeno Der p 1 y su capacidad de inducir la síntesis de Ig E, se encuentran en relación con su actividad catalítica cisteín proteasa, de manera que puedan identificarse secuencias homólogas de los 30 aminoácidos que conforman el residuo cisteín catalítico (Cys 34). De éste modo, mediante análisis estructurales de alineamiento, se ha comprobado que diversos alérgenos, como por ejemplo la cisteín proteasa papaína, la lipocalina de transporte Mus m1, el alérgeno de ambrosía Amb a 5 presentan una homología del citado interdominio Cys 34 (Furmonaviciene. 2001).

Las concentraciones de Der p 1 sensibilizantes se han establecido en su apartado de factor de riesgo como superiores a los 9 mcg/g de polvo en pacientes monosensibilizados y superiores a los 2 mcg/g en polisensibilizados (Kuehr. 1994)



**Grupo 3: serin proteasa (tripsina)****Der p 3 y análogos**

Se trata de una proteína de 30 kDa para Der p 3 y de 24.9 kDa para Der f 3 de peso molecular. El gen de Der p 3, codifica una proteína de 261 aminoácidos, lo que es indicativo de su síntesis como pre-prozimógeno al igual que acontece con otras tripsinas y presenta una homología del 50% con otras serin proteasas como la quimotripsina (Stewart G A. 1992). La secuencia de Der p 3 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, tiene una homología del 81% con el Der f 3 del *Dermatophagoides farinae* y ambas exhiben un 41% de identidad con la tripsina bovina.

Es común en el Grupo 3 la presencia de isoformas y se ha descrito para Der p 3 una frecuencia de fijación de Ig E entre el 51 y 90% de los pacientes sensibilizados a ácaros, así como de entre el 42 y el 70% para Der f 3 (Stewart G A. 1996).

El alérgeno Eur m 3 de *Euroglyphus mainey* se encuentra incluido en éste grupo y recientemente el alérgeno Blo t 3 de *Blomia tropicalis* ha sido caracterizado e incluido así mismo en éste Grupo 3 (Flores I. 2003).

**Grupo 4: anhidrasa carbónica****Der p 4 y análogos**

Se trata de alérgenos similares a la enzima anhidrasa carbónica, de pesos moleculares de 56 kDa para Der p 4 y 63 kDa para Der f 4, con una frecuencia estimada de fijación a Ig E entre el 25 y el 46% y una elevada homología con la  $\alpha$ -amilasa (Lake F R. 1991).

**Grupo 6: serin proteasa (quimotripsina)****Der p 6 y análogos**

Der p 6 y Der f 6, conforman el Grupo 6 de serin proteasas (quimotripsina), con una homología del 37% con Der p 3 (Bennett B J. 1996). Presentan un peso molecular de 25 kDa y muestran una frecuencia de unión a Ig E entre el 40 y el 60%.

**Grupo 8: glutathion-S- transferasa****Der p 8 y análogos**

Se trata de alérgenos con una gran homología con la glutathion-S-transferasa de ratas y ratones, de un tamaño molecular de 26 kDa (O'Neil. 1994). Presenta una frecuencia de reconocimiento de Ig E del 40% y muestra una homología del 25% con el alérgeno Bla g 5 de la cucaracha *Blattella germanica*, aunque no ha podido ser demostrada una reactividad cruzada entre ambos.

**Grupo 9: serin proteasa (colagenolítica)****Der p 9 y análogos**

Se trata de una serin proteasa que exhibe una actividad colagenolítica y que presenta un tamaño molecular de 24 kDa, con una frecuencia de fijación de Ig E estimada en el 80% (King C. 1996). Muestra reactividad cruzada con alérgenos de los Grupos 3 (Der p 3) y 6 (Der p 6).

**Grupo 15: chitinasas****Der f 15 – Der f 18 y análogos**

Se trata de glicoproteínas de peso moleculares en el entorno de los 60 kDa y homólogas a las chitinasas de insectos, que presentan un reconocimiento de la Ig E sérica humana del 70% y de perro (Mc Call C. 2001).

**II) Alérgenos de unión a ligandos****Grupo 2: proteínas de unión a lípidos de naturaleza epididimal****Der p 2 y análogos**

Lo conforman proteínas termo y pH estables de 14 kDa de peso molecular (Ovsyannikova. 1994), con un grado de homología interespecie entre Der p 2 y Der f 2 del 88% e intergénero del 28% del alérgeno Lep d 2 de la especie *Lepidoglyphus destructor* (Chua. 1990).

Der p 2 y Der f 2 son proteínas de naturaleza secretora sintetizadas y liberadas a partir del aparato reproductor de ácaros machos (Thomas WR. 1995). Presentan un grado de polimorfismo localizado en las regiones que contienen los epitopos T conformacionales de su estructura (Chua. K Y. 1996). El gen que expresa Der f 2 codifica una proteína de 122 aminoácidos, con una homología del 30% con una familia de proteínas epididimales humana, bovina y de chimpancé y sugiere se trata de una proteína de unión a lípidos (Derewenda U. 2002).

Se han incorporado alérgenos análogos del Grupo 2 como Eur m 2 (Morgan. 1997), Tyr p 2 (Eriksson T L 1998), Gly d 2 (Gafvelin G. 2001) procedentes de las especies *Euroglyphus maynei*, *Tyrophagus putrescentiae* y *Glyciphagus domesticus* respectivamente.

**Grupo 13: proteínas de unión a ácidos grasos****Der f 13 y análogos**

El Grupo 13 fué inicialmente creado para la inclusión de alérgenos descritos a partir de la especie *Blomia tropicalis* y su alérgeno Blo t 13, un análogo de la familia de proteínas citosólicas de unión a ácidos grasos y que se encuentran en muchas especies (Puerta L. 1999).

Análogos alérgenos al Blo t 13 de *Blomia tropicalis*, como Aca s 13 de la especie *Acarus siro* (Eriksson T L. 1999) y Lep d 13 de la especie *Lepidoglyphus destructor* (Eriksson T L. 2001) han sido descritos con frecuencias de unión a Ig E del 11%, 23% y 13% respectivamente.

Entre diferentes especies del género *Dermatophagoides*, como *Dermatophagoides siboney* (Labrada M. 2002) y *Dermatophagoides farinae* (Lim S H. 2000) se han descrito Der s 13 y Der f 13, lo que ha llevado a conformar su inclusión grupal en los alérgenos de *Dermatophagoides*.

#### **Grupo 14: Apolipoforinas ligadas al transporte de lípidos**

##### **Der p 14 y análogos**

Se trata de una proteína de naturaleza apolipoforinica ligada al transporte de lípidos, que presenta un peso molecular de 189 kDa muy elevado y habitualmente inusual en los alérgenos.

Se ha descrito en especies del género *Dermatophagoides*, lo componen Der p 14 y Der f 14 de las especies *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, así como en la especie *Euroglyphus maynei* Eur m 14 (Epton M J. 2001).

#### **Grupo 16: Gelforinas ligadas al transpote de Ca<sup>++</sup> y reguladoras (PIP2)**

##### **Der p 16 y análogos**

Se trata de proteínas fijadoras de Calcio, cuya secuencia de aminoácidos muestra una similitud con la gelsolina, proteína que interviene en la regulación de la polimerización de los filamentos de actina. Muestra una frecuencia de unión a Ig E del 47% (Kawamoto S. 2002).

### **III) Alérgenos en relación con el citoesqueleto: Panalérgenos**

#### **Grupo 10: Tropomiosinas**

##### **Der p 10 y análogos**

Proteínas de 32 kDa de peso molecular que presenta una homología muy elevada con las tropomiosinas de muchas especies (Aki T. 1995). Responden al término de panalergeno, dada su elevada reactividad cruzada y en el caso específico del alergeno Der p 10 de la especie *Dermatophagoides pteronyssinus* se ha demostrado y calificado el síndrome ácaros-mariscos que involucra una reactividad cruzada entre ácaros, gambas e insectos en los pacientes alérgicos a gamba (Wittelman A. 1994).

Análogos alérgenos como Blo t 10 de la especie *Blomia tropicalis*, muestran una homología entre las tropomiosinas de especies del género *Dermatophagoides* superiores al 96% y parece que exhiben un único epitopo fijador de Ig E (Yi F C. 2002).

**Grupo 11: Paramiosinas****Der p 11 y análogos**

El alérgeno más estudiado es el Der f 11 de la especie *Dermatophagoides farinae*, que presenta una homología entre el 34% y el 60% con otras paramiosinas (Tsai L C. 2000) y presenta un peso molecular de 98 kDa. Un alérgeno análogo Blo t 11 ha sido identificado en la especie *Blomia tropicalis* y presentan una frecuencia de fijación de Ig E en el entorno del 50% de los pacientes asmáticos sensibilizados a ácaros (Ramos J. 2001).

**III) Alérgenos de actividad biológica desconocida****Grupo 5****Der p 5 y análogos**

Se trata de una proteína de 13 kDa, con una frecuencia de fijación de Ig E en el entorno del 50% y una homología estimada en el 40% entre Der p 5 y Blo t 5 de las especies *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Blomia tropicalis* (Arruda K. 1997). Blo t 5 es reconocido entre el 60% y 70% de los pacientes con asma en las áreas tropicales.

**Grupo 7****Der p 7 y análogos**

Se trata de proteínas de 22 – 28 kDa con un 86% de homología entre los alérgenos Der p 7 y Der f 7 de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, con una prevalencia en la fijación de la Ig E en el entorno del 50% (Shen H D. 1995).

**Grupo 12****Blo t 12**

Aislado a partir de cDNA de *Blomia tropicalis*, presenta un peso molecular de 14 kDa y una frecuencia de fijación de Ig E del 50%. No muestra ninguna homología con otras proteínas (Puerta L. 1996).

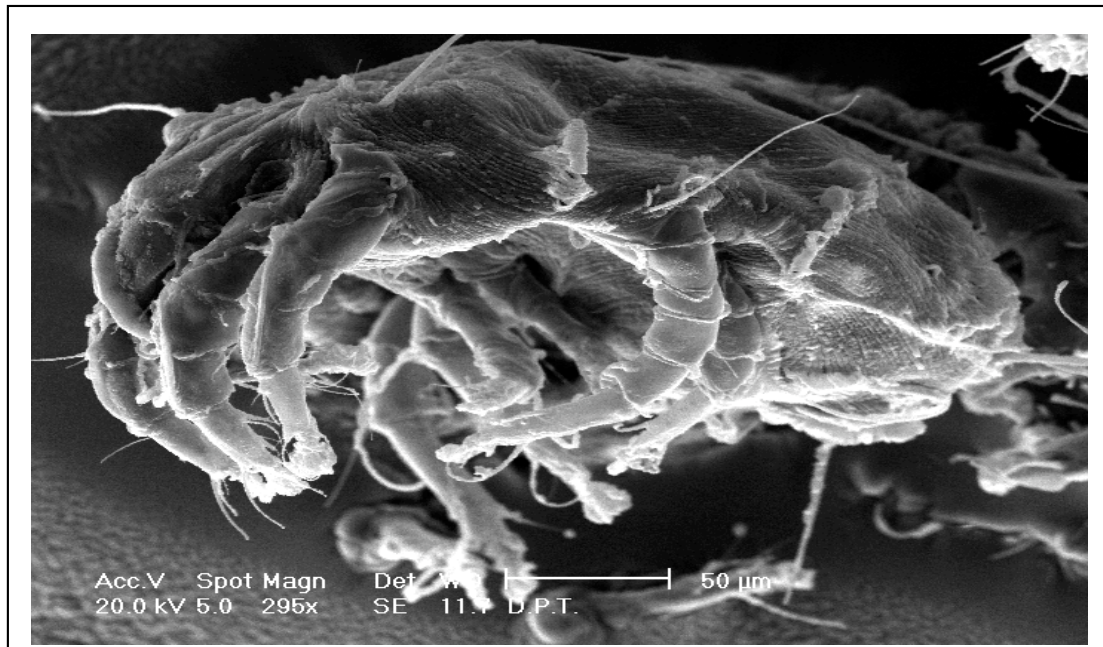
**IV) Otros alérgenos de ácaros no agrupados****Der f 17**

Se trata de una proteína fijadora de calcio de 53 kDa de peso molecular, con una frecuencia de unión a Ig E del 35% (Tategaki A. 2000).

**Blo t 19**

Se trata de un péptido antimicrobiano de 7.2 kDa de peso molecular, con una frecuencia de fijación de Ig E en el entorno del 10% de pacientes sensibilizados.

La figura 11 muestra una fotografía al microscopio electrónico del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*.



**Figura 11:** *Dermatophagoides pteronyssinus*. Microscopía electrónica original

### 5. Reactividad cruzada:

La mayoría de los pacientes sensibilizados a los ácaros del polvo doméstico presentan multisensibilizaciones a varias especies, dado el grado de homología y el compartimiento de epitopos involucrados en la fijación de Ig E, tal y como hemos comprobado en el apartado anterior. Este fenómeno de reactividad cruzada es más pronunciado entre las especies que pertenecen a la familia Pyroglyphidae y es mínima entre los miembros de ésta familia y los miembros de otras familias (van Hage-Hamsten M. 1987).

La especie *Blomia tropicalis* presenta una mínima reactividad cruzada con especies del género *Dermatophagoides* y una elevada reactividad cruzada con la especie *Lepidoglyphus destructor* (Johansson E. 1997), lo que muestra la relevancia de *Blomia tropicalis* a la hora de inducir sensibilizaciones específicas (Stanaland B. 1994).

Los alérgenos de los Grupos 1 y 2 son probablemente los más importantes de los ácaros y de entre ellos los que se corresponden con las características excretoras-secretoras y que se encuentran presentes en los cuerpos y en las heces (Aalberse R C. 1998).

En otro orden hay que considerar las prevalencias de sensibilización en invertebrados, como es el caso del nematodo *Anisakis simplex*, parásito común del pescado y que presenta reactividad cruzada con ácaros del polvo doméstico como *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* y *Dermatophagoides pteronyssinus* y en el que el alérgeno primario parece ser el Grupo 10 atribuible a la tropomiosina y cuya relevancia clínica aún queda por demostrar (Johansson E. 2001) y análogamente acontece con otros ácaros parásitos como *Sarcoptes scabiei* que también tiene reactividad cruzada con *Dermatophagoides pteronyssinus* (Fisher K. 2003).

## **HIPÓTESIS**





El mejor conocimiento bioquímico de las proteínas contenidas en los extractos alergénicos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, permitirá un diagnóstico mejor, y más seguro de cada paciente. Esta caracterización más precisa del patrón de sensibilización que presenta, permitirá establecer el pronóstico de la enfermedad en cada caso y establecer tratamientos más seguros y eficaces.

El uso de moléculas puras de alérgenos mayoritarios obtenidas por recombinación se ha demostrado útil en estudios previos, pero para que la proteína obtenida sustituya eficazmente a la nativa, es indispensable que sus propiedades moleculares sean exactas, ya que ello condiciona la estructura tridimensional de la molécula y el grado de accesibilidad del Fab de los anticuerpos al epítipo determinante.

Por este motivo, nos proponemos usar alérgenos recombinantes como inmunógenos, para generar anticuerpos de captura que permitan aislar los alérgenos mayoritarios de los extractos completos, obtenidos de cultivos de ácaros, para su uso en el diagnóstico y tratamiento.

Tras comprobar su inocuidad, se intentará demostrar su utilidad para el diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, de pacientes sensibilizados a *Dermatophagoides pteronyssinus*.



## **OBJETIVOS**



Vistos los antecedentes acerca del estudio de los extractos alergenicos de ácaros del polvo doméstico, se puede comprobar como los alérgenos mas frecuentes se encuentran bien caracterizados y se corresponden con los alérgenos mayores del Grupo 1 y 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

La utilización de tales alérgenos mayores y clínicamente relevantes, en su forma nativa, es el principal objetivo para conseguir mejorar el diagnostico y ulteriormente la inmunoterapia específica.

Por todo ello, se han planteado los siguientes objetivos en este trabajo.

1. Desarrollo de formas recombinantes de los alérgenos rDer p 1 (Grupo 1) y rDer p 2 (Grupo 2) del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*
2. Desarrollo de inmunógenos a partir de formas recombinantes de los alérgenos o péptidos señal de los mismos para los Grupos 1 (Der p 1) y 2 (Der p 2) de ácaros y específicos de la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*.
3. Obtención de antisueros en conejo y purificación de anticuerpos específicos frente a los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2.
4. Desarrollo productivo de los alérgenos Der p 1 y Der p 2 nativos y purificados a homogeneidad que nos permitan validar su utilización a nivel diagnóstico y constituyan una referencia de la producción de extractos alérgénicos.
5. Evaluación del perfil toxicológico de los alérgenos de Der p 1 y Der p 2, que justifique su seguridad de uso clínico.
6. Determinación de la actividad biológica “in vivo” y potencia alérgica “in vitro” de los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2 .
7. Estudio comparativo de las cinéticas alergenicas de los extractos convencionales versus los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2 mediante pruebas “in vivo” e “in vitro”.

Definición del índice de alergenidad de los alérgenos Der p 1 y Der p 2



## **MATERIALES Y METODOS**





### **1. Selección de inmunógenos**

#### **1.1: Alérgenos recombinantes**

##### **Fundamento teórico**

La expresión recombinante de DNA proporciona un sistema de producción ilimitada de proteínas altamente homogéneas cuya presencia en la naturaleza es escasa o, en todo caso, su aislamiento implique dificultades.

Esta tecnología se basa en aislar el RNA mensajero y obtener su correspondiente DNA complementario (cDNA). La secuencia de interés, completa o parcial de una proteína, se amplifica utilizando cebadores ('primers') específicos. Este cDNA, previamente amplificado por PCR, se inserta en un vector génico que, replicado en una célula huésped, sirve de vehículo de expresión para la producción de una molécula recombinante. Una vez transformadas con el vector las células del huésped (en general bacterias, levaduras o células de insecto –usando baculovirus–), el cultivo se hace crecer hasta que alcanza unos niveles de producción adecuados de la proteína recombinante. La elección del sistema de expresión de este cDNA es trascendental para determinar las propiedades estructurales particulares de la proteína objetivo: presencia de puentes disulfuro, plegamientos, glicosilaciones y otras modificaciones post-traduccionales. Para que la proteína recombinante sustituya eficazmente a la proteína obtenida de la fuente biológica natural, es esencial comprobar que sus propiedades moleculares son equivalentes. Por ese motivo, la caracterización estructural y funcional de la proteína recombinante es una etapa crítica a la hora de valorar el sistema de expresión utilizado.

En ocasiones, para facilitar las distintas etapas del proceso, la inducción y posterior aislamiento, es conveniente expresar un DNA que contenga enlazados el DNA de la proteína objetivo junto con el codificante para otra cadena polipeptídica, que puede ser la de una proteína completa o bien un fragmento peptídico (por ejemplo, cadenas de histidinas, epítopo FLAG, etc.) . En ese caso, se produce una proteína de fusión. Posteriormente, la proteína así producida debe ser purificada hasta homogeneidad, para lo cual se hace uso de sus propiedades químico-físicas, peso molecular, solubilidad, carga, etc.

Posteriormente, en el desarrollo productivo de alérgenos recombinantes se debe validar su utilización tras comprobar mediante:

- Estudios de similitud con proteínas nativas.
- Obtención de anticuerpos específicos contra las proteínas obtenidas.
- Utilización de los anticuerpos generados para la purificación de alérgenos nativos a partir de extractos alérgicos crudos.

Los alérgenos recombinantes son por tanto útiles para la mejor estandarización y cuantificación de los extractos alérgénicos, así como para el diseño de sistemas de purificación de alérgenos nativos por afinidad mediante el empleo de los anticuerpos específicos generados frente a ellos y constituyen un paso previo a su ulterior utilización clínica tras su correspondiente desarrollo preclínico y clínico, que permita comprobar su eficacia y seguridad de uso.

### Clonación

El sistema de expresión en células de insecto mediante la infección con baculovirus nos permite obtener proteínas con un grado alto de fidelidad con respecto a la proteína nativa, y con suficiente rendimiento productivo.

#### i.1) Extracción de RNA total del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*

- a) La extracción del RNA del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* se produjo utilizando los métodos del trizol (protocolo Invitrogen, Life technologies), y del tampón de extracción Z6.

Tampón de extracción (Z6), para 400 mL:

Cloruro de Guanidina	305,7gr
MES	1,56gr
EDTA	30gr

- b) Se conservó el RNA a -20°C resuspendido en 100 µL de agua pura y estéril
- c) Se analizó en un gel desnaturalizante 1.5% en MEN (20mM MOPS, 5mM Acetato Sodico, 2 mM EDTA, pH 7)

#### i.2) Amplificación por RT-PCR

- Se diseñaron los oligos para amplificar los diferentes cDNAs. Para ello se estudió la secuencia publicada de los RNAs de Der p 1 y Der p 2 y se diseñaron los oligos “forward” con un sitio de restricción (EcoRI o BamHI), seguido de la secuencia de los primeros nucleótidos comenzando por el ATG inicial. El oligo “reverse” se diseñó añadiendo en fase a los últimos nucleótidos codificantes, la secuencia codificadora para 6 histidinas y seguida del codón de finalización y de otro de restricción (HindIII o SpeI). La síntesis de dichos oligos se hizo a través de Genotek, S.A (Genotek, S.A, Sabadell, Barcelona). La inclusión de sitios de restricción únicos a ambos extremos (5´y 3´) del cDNA facilitaría su posterior clonaje en el vector de baculovirus.

- **Oligonucleotidos para el clonaje del cDNA Der p 1 y Der p 2:**

## Der p 1 Forward:

5'-CGC **GGA TCC** **ATG** AAA ATT GTT TTG GCC - 3'  
BamHI Met

**Der p 1 Reverse:** Stop

5' CGC **ACT AGT** TA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GAG AAT GAC  
 SpeI 6x His 24 nt cDNA  
 AAC ATA TGG ATA TTC - 3'

## Der p 2 Forward:

5' CGC **GAA TTC ATG** TAC AAA ATT TTG TGT C – 3'

EcoRI Met

**Der p 2 Reverse:** Stop

5' CGC **AAG CTT** A GTG ATG GTG ATG GTG ATG ATC GCG GAT TTT  
HindIII 6x His 24 nt cDNA  
AGC ATG AGT AGC – 3'

### i.3) Obtención de los cDNAs Der p 1 y Der p 2

## Transcripción inversa del RNA total

Para la obtención del cDNA de *Dermatophagoides pteronyssinus* fue necesario extraer el RNA Poly A+ del RNA total. Para ello se utilizo el kit oligotex mRNA minikit (Qiagen). Posteriormente se realizo la transcripción inversa utilizando como cebador un oligo dT. Para la reacción de la transcripción inversa se utilizo el kit “1st strand síntesis kit for RT-PCR (AMV) de Roche (Roche, Basilea, Suiza)

## Amplificación de los cDNAs

Para la amplificación del RNA-cDNA de *Dermatophagoides pteronyssinus* se utilizó el oligo dT y de cDNA-DNA los oligos específicos de Der p 1 y Der p 2. El cDNA de Der p 1 tiene un tamaño de aproximadamente 960 pbs y el correspondiente a Der p 2 de 500 pbs.

### i.v) Clonaje en pFastBac 1

## Digestiones

Se digiere el fragmento de cDNA de Der p 1 y el plásmido pFastBac 1 con BamHI y SpeI. El fragmento cDNA de Der p 2 y el plásmido pFastBac 1, se digiere con EcoRI y HindI.

### **Ligaciones**

Se cuantificó en un gel de agarosa y se ligó el cDNA al plásmido pFastBac digerido con los enzimas correspondientes T4DNA ligasa y se incubaron toda la noche a 4°C.

#### **i.5) Transformación**

- a) Se precipitaron los ligamientos, y se lavaron dos veces con etanol 70%.
- b) Se transforman los ligamientos Fbac-Der p 1 y Fbac-Der p 2 en células competentes *Escherichia coli* X-L1.
- c) Se utilizaron 5 µL de ligamiento (el resto se conserva en glicerol al 15% a -80°C).
- d) Se sembró en placas de LB/ampicilina
- e) Se incubó toda la noche a 37°C

#### **i.6) Selección de recombinantes**

Se realizó colony-PCR con oligos flanqueantes de pFastBac 1 de las colonias supuestamente transformantes. Los alineamientos de las secuencias de DNA y de aminoácidos presentes en los plásmidos Fbac Der p1 y Fbac Der p 2, muestran al compararse con el banco de datos DP11695 (Der p 1) y AX398783 (Der p 2) una identidad del 98.8% y 99.3% respectivamente.

Se almacenaron como stocks a -80°C cultivos saturados con las colonias de Fbac-Der p 1 y Fbac-Der p 2 transformantes en 15% de glicerol.

#### **i.7) Transformación células DH10Bac: ADNs Fbac-Der p 1 y Fbac Der p 2**

Los bácmidos recombinantes se obtienen mediante la transposición de un elemento transponible desde el plasmido donante pFastBac a un sitio de unión de dicho elemento en el bácmido. El elemento transponible lleva un gen de resistencia a gentamicina, un promotor específico de baculovirus, el gen que queremos expresar y una señal de poliadenilación.

Las inserciones en el bácmido interrumpen la expresión del péptido lacZa, por lo que las colonias que contienen el bácmido recombinante son blancas en un fondo de colonias azules que tienen el bácmido inalterado.

- a) Se prepararon los plásmidos Fbac-Der p 1 y Fbac-Der p 2 a partir del crecimiento de las colonias recombinantes en 4 mL de LB-Amp, utilizándose para ello el kit Miniprep de Nautilus. Al final se resuspendió en 60  $\mu$ L.
- b) Se transformaron las células DH10Bac competentes con los DNAs Fbac-Der p 1 y Fbac-Der p 2, según el protocolo recomendado por Invitrogen, Life technologies
- c) Se utilizaron 6  $\mu$ L de DNA (unos 500-750 ng) y 10  $\mu$ L de células competentes.
- d) Se sembraron en placas en medio sólido (LB-Tet-Gent-Kan).
- e) Se incubaron toda la noche a 37°C
- f) Se repicaron algunas bacterias para poder distinguir bien las colonias blancas (con bácmido recombinante) de las azules.

### **i.8) Aislamiento del DNA del bácmido recombinante**

Para el aislamiento se preparó el DNA de bácmidos recombinantes y para confirmar la presencia de DNA de bácmido recombinante se realizó una amplificación de dicho DNA mediante PCR, utilizando como cebadores los oligonucleótidos universales derecho e inverso.

La presencia de bácmido no recombinante da como resultado una banda de 3300 pbs. La presencia de bácmido transpuesto con la secuencia de pFastBac 1 da como resultado una banda de 2300 pbs. La presencia de bácmido recombinante da como resultado una banda de 2300 + tamaño del inserto correspondiente.

Se escogieron los bácmidos y posteriormente se amplificaron con los oligos flanqueantes del cDNA y se comprobó, de nuevo, que las secuencias de dichos bácmidos eran correctas.

### **i.9) Transfección y recogida de virus stock**

Una vez purificados los bácmidos y analizada la presencia del gen recombinante, estos se utilizan para transfectar  $1 \times 10^6$  células de insecto (H5) con 10 mcl de los distintos DNA de bácmidos recombinantes.

- a) Se despegaron células H5 de *Trichoplusia ni* de una placa 150 mm de diámetro en medio TC100 (Sigma) con 10% de suero fetal bovino (Sigma). Normalmente en 10 mL.

- b) Se contaron células de los dos cuadrantes del contador y se hizo la media. Dichas células  $\times 10^4$  son las que hay en 1 mL de medio.
- c) Se calculó el medio que se necesita para tener  $1 \times 10^6$  células y se añadieron  $1 \times 10^6$  células / pocillo y medio para completar 1 mL.
- d) Se dejaron reposar las células para que se pegasen al fondo, 1 h a  $28^\circ\text{C}$ .
- e) Se retiró el medio y se lavó con 1 mL de medio sin suero.
- f) A continuación se añadió otro mL de medio sin suero y se dejó 30 min. a  $28^\circ\text{C}$ .

Para preparar la “**transfection mix**”:

10  $\mu\text{g}$  de DNA de bácmido  
30  $\mu\text{g}$  de lipofectina  
60  $\mu\text{g}$  de TC 100 sin suero.

- a) Al cabo de los 30 min. se quitó el medio, y se añadió a la mezcla de la transfección, 900 mL de medio sin suero. A continuación se añadió dicha mezcla (1 mL) a cada pocillo.
- b) Se mantuvieron de 4-5 h a toda la noche a  $28^\circ\text{C}$ .
- c) Se descartó la mezcla de la transfección y se añadió medio + suero (2 mL/pocillo).

### **i.10) Recogida de virus stock 1**

- a) A las 72h después de la transfección se recogió el medio de las células y se centrifugó 5 min.
- b) Se transpasó a un tubo con rosca y se guardó como stock 1 a  $4^\circ\text{C}$ .

### **i.11) Infecciones con virus stock 1**

- a) Se despegaron las células y se pusieron  $1,5 \times 10^6$  células/pocillo. Se dejaron 1 h. a  $28^\circ\text{C}$ .
- b) Se retiró medio hasta 1 mL. y se añadió virus (50  $\mu\text{L}$  y 200  $\mu\text{L}$ ). Se dejó 1 h. a  $28^\circ\text{C}$ .
- c) A continuación se añadió 1 mL de medio + suero, y se mantuvieron en el incubador durante 72h.
- d) Pasadas las 72 h. se recogieron las células y el medio, despegando las células con la pipeta. Se centrifugaron 5 min. y se tiró el sobrenadante. En el pellet se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. y 1  $\mu\text{L}$  de DNAsa

- e) Se dejaron 15 min. en hielo y se añadieron 20  $\mu$ L de buffer 5X  $\beta$ -mercaptoetanol.
- f) Se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
- g) Para cargar en gel se calentó 2 min. a  $95^{\circ}\text{C}$  y se cargaron 7  $\mu$ L.

### **i.12) Amplificación del virus stock 1**

- a) Se añadió a una placa grande de 150 mm confluyente con 20 mL de medio + suero, 25 mL de virus stock 1.
- b) Se mantuvieron 7 días en el incubador y se recogieron las células y el medio, se centrifugaron 5 min. a 5000 rpm y se pasó el medio a otro tubo falcon, guardándose a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **i.13) Infecciones con virus amplificado (time course)**

El título del virus amplificado fué de alrededor  $5 \times 10^7$  pfu/mL.

Una placa de 6 pocillos tiene  $1,5 \times 10^6$  células/pocillo, por lo tanto la infección será con 2 pfu/célula.

Cálculos:

$$1,5 \times 10^6 \text{ células/pocillo} \times 6 \text{ pocillos} = 9 \times 10^6.$$

$$9 \times 10^6 \text{ células} \times 2 \text{ pfu/célula} = 18 \times 10^6 \text{ pfu.}$$

$$18 \times 10^6 \text{ pfu} / 5 \times 10^7 \text{ pfu/mL} = 0,36 \text{ mL.}$$

- a) Se prepararon 6 mL medio sin suero + 0,36 mL de virus amplificado, y se añadió 1 mL. por pocillo.
- b) Para realizar las infecciones se prepararon  $1,5 \times 10^6$  células/pocillo en 1 mL de medio sin suero y se mantuvieron durante 1 h. a  $28^{\circ}\text{C}$ .
- c) Se eliminó el medio y se añadió el virus. Se mantuvo 1 h. a  $28^{\circ}\text{C}$ . y a continuación se añadieron 2 mL de medio + suero por pocillo.
- d) Se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$ , y se recogieron muestras a tiempo 0, 24, 48, 72 y 96 h.

### **i.14) Infecciones con virus amplificado (placa 150 mm)**

- a) Sobre una placa de 150 mm confluyente, se eliminó el medio y se prepararon 0,6 mL de virus amplificado + 4,5 mL de medio sin suero por placa.
- b) Se añadieron 5 mL a la placa. Se incubó 1h. a  $28^{\circ}\text{C}$ .

- c) A continuación se añadió medio + suero hasta 20 mL por placa de 150 mm.

### **i.15) Estudio de la expresión proteica**

Se infectaron placas de células de insecto con  $1 \times 10^6$  células con 50  $\mu$ L y 200  $\mu$ L de virus stock. Pasadas 72 horas se recogieron las células, se lisaron y se estudió la expresión génica de dichas células infectadas en geles de acrilamida al 12% desnaturalizantes.

El gel de proteínas obtenido se transfirió a una membrana de PVDF durante 1 hora a 200 mA. Posteriormente se incubó con un primer anticuerpo monoclonal antihistidinas (Amersham biosciences) y posteriormente con un anticuerpo secundario antiratón ligado a peroxidasa (Sigma)

### **Purificación de los alérgenos rDer p 1 y rDer p 2 de extractos celulares**

Una vez comprobada la detección de dichas proteínas con el antisuero y sueros de pacientes sensibilizados a *Dermatophagoides pteronyssinus*, se procedió a la producción de la proteína a mayor escala y a su purificación.

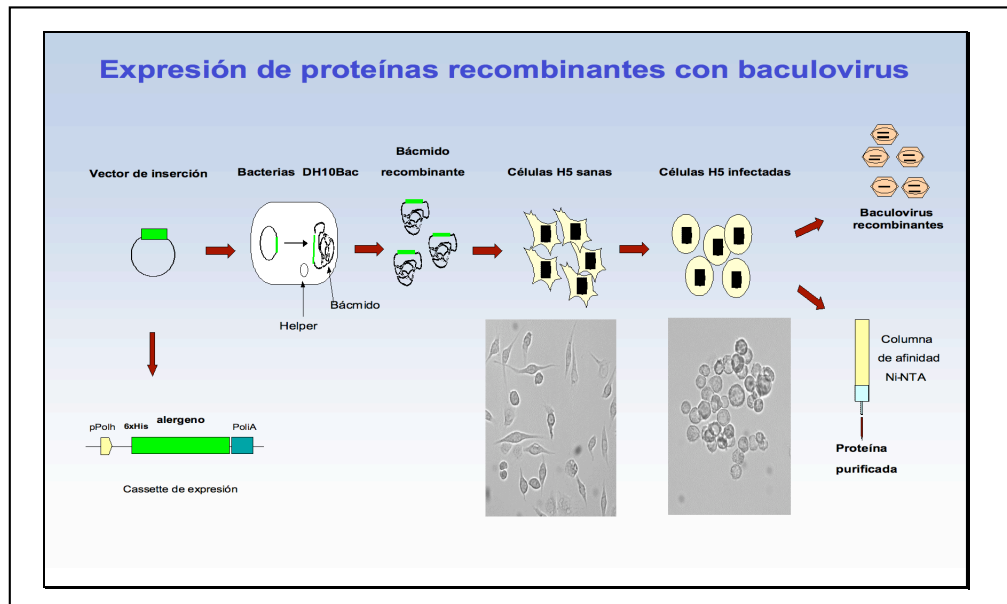
En cada caso, el virus stock 1, resultante de la transfección, se amplificó en placa una placa de 150 mm de diámetro. Para ello se infectó una placa de 150 mm confluyente con 25  $\mu$ L del virus stock 1. Al cabo de una semana se recogieron las células, se "centrifugaron" y se guardó el sobrenadante de la infección, que llamamos virus stock amplificado.

Posteriormente se realizaron infecciones con el virus stock amplificado en placas de 35 mm y se analizó la expresión a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección. Se observó que la expresión comenzaba a las 48 horas y se mantenía a las 72 y a las 96 horas post infección. Se escogió las 72 horas post-infección como tiempo óptimo para obtener la máxima producción de proteína.

Se infectaron 20-30 placas de 150 mm de diámetro de células confluentes con cada virus amplificado a MOI (multiplicidad de infección) aproximadamente 1. Se realizó una adsorción de virus a 28°C durante 1 hora en medio sin suero (5 mL). Posteriormente, se completó con medio con suero hasta 20 mL y se incubó durante 72 horas. Se recogieron las células y se procedió a la purificación de dichas proteínas.

La purificación se realizó utilizando la resina "TALON" Metal Affinity Resin" (Clontech Cat N° 8901). La proteína recombinante 6His se une a la resina por afinidad de las histidinas a los metales de la resina. Para purificar las proteínas se utilizó un tampón desnaturalizante (Tampón fosfato 50mM pH7, 300-500mM ClNa, 6M Cloruro Guanidina), posteriormente se sonicaron los extractos, se centrifugaron y los sobrenadantes se incubaron con la resina. Las proteínas se eluyeron en tampón EDTA 50 mM.





**Figura 12: Resumen clonación y purificación proteína**

## 1.2) Péptidos

La definición de péptidos inmunizantes se realizó sobre la base de seleccionar una secuencia en relación con el sitio activo de la proteasa que conforma la actividad del alérgeno Der p 1. Para ello se consultó la base de datos de la dirección <http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P08176> y se conformaron dos péptidos suministrados por Eurogentec. Cultek, que responden a:

- aa 250 – 265 -> NH<sub>2</sub> – HYDGRTIIQRDNGYQP – CONH<sub>2</sub>
- aa 283 – 298 -> NH<sub>2</sub> – YWIVRNSWDTNWGDNG – CONH<sub>2</sub>

que refieren una asparragina (N) en posición 288 y que podría estar en relación con parte del sitio activo (“ACT SITE”) de la citada proteasa.

## 2 : ANTISUEROS EXPERIMENTALES

### Fundamento teórico

Existe un cierto número de factores que pueden ser manipulados para obtener una respuesta inmune favorable hacia un antígeno determinado. Todos ellos están relacionados con el proceso de inmunización e incluyen la elección del animal, dosis y forma del inmunógeno, vía de administración, número de inyecciones y periodo transcurrido entre dichas inyecciones (Harlow, 1988). La obtención de anticuerpos apropiados depende, en gran medida, del régimen de inmunización elegido, y por tanto, de la determinación de las características concretas de cada uno de los factores citados.

En general, en el proceso de inmunización hay que tener en cuenta varias consideraciones:

- a) Las inmunizaciones deben hacerse en animales tan alejados de la escala evolutiva de la fuente del antígeno como sea posible, con objeto de asegurar una respuesta inmune activa y evitar fenómenos de autotolerancia. Para el caso concreto de la producción de anticuerpos policlonales (monoespecíficos) suelen usarse conejos.
- b) La maduración del sistema inmune se alcanza a diferentes tiempos postnatales, según la especie animal. Los conejos son considerados adultos a los 6 meses de vida.
- c) Animales individuales, aun y cuando sean isogénicos, pueden introducir respuestas inmunes completamente diferentes frente a preparaciones antigénicas idénticas. Además, los animales de laboratorio ocasionalmente pueden morir como consecuencia de la manipulación experimental, por lo que siempre es aconsejable inmunizar a más de un animal para cada tipo de ensayo.

### 2.1: Inmunización y protocolos

Para la obtención de antisueros policlonales (monoespecíficos) se inmunizaron conejos usando las proteínas alergénicas recombinantes y los péptidos. Se siguieron protocolos estándar en los que se inyectan los alérgenos o péptidos, en adyuvante completo de Freund, alternativamente por vía subcutánea e intramuscular aproximadamente cada 15 días. La última recolección de sangre se hace a los 80 días de la primera inmunización. El título de anticuerpo y su especificidad se analizan mediante técnicas de ELISA e inmunotransferencia.

El protocolo fue desarrollado tal y como indica el cuadro que figura mas abajo en Eurogentec, Bélgica.

La cantidad necesaria por inyección fué de 20-100 µg del alérgeno o péptido seleccionado.

Día	0	14	28	38	56	66	80
Inyección	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>		4 <sup>a</sup>		
Sangrado	Preimmune			2 mL		2+20 mL	60 mL

### 3. OBTENCION Y PROCESADO DE LA FUENTE ALERGÉNICA

#### 3.1: Obtención del extracto

La fuente natural de materia prima conteniendo el medio de cultivo, ácaros adultos, formas inmaduras y huevos del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* fué obtenida por cultivo de 12 semanas en condiciones de humedad relativa del 80% y temperatura controlada de 25° C. Una vez conseguido el adecuado crecimiento se sometió a congelación a - 80°C.

#### 3.2: Homogeneización

Previo a su homogeneización, la materia prima se disolvió en tampón de Coca (10 g Cloruro sódico, 4 g de Bicarbonato sódico, 4 mL de Tween 20 y 1 litro de agua desionizada) y fue sometida a un proceso de rotura en un aparato Politron PT 2100 (Kinematica AG) en dos ciclos de 1 minuto a 4°C.

#### 3.3: Extracción

El homogeneizado fué sometido a extracción hidrosoluble (tampón Coca) al que se añadió 1µg/mL de pepstatin A (ref L9783, Sigma) 1 µg/mL de leupeptina (P5318, Sigma) y PMSF a 1mM (phenylmethilsulfonyl fluoride) (P7626, Sigma) como inhibidores enzimáticos de proteasas, manteniéndose en agitación magnética a una temperatura de 4° C, durante 5 horas.

#### 3.4: Filtración y diálisis

La fracción hidrosoluble se centrifugó a 8.400 g x 30 min. 4° C, en una centrífuga Rotanta RS (Hettich), tras la cual se descartó el sedimento. El sobrenadante obtenido fué filtrado con vacío, en un conjunto de embudo Buchner y matraz Kittasato, a través de filtros de profundidad Millipore AP (Millipore) y posteriormente sometido a proceso de diálisis en membrana con limite de exclusión de 7 kDa (Medicell International), durante 12 horas a 4° C frente a agua desionizada. Tras su filtrado con un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore), se procedió a su congelación a - 80° C, (Sanyo MDF - 235).

#### 3.5: Estabilización

La estabilización se realizó mediante liofilización en una planta Liogamma Telstar 20/40 (Telstar) según una receta expresadas en la tabla 7.

DESCRIPCION	TEMPERATURA (° C)	VACÍO (mbar)	h: min.
Preparación bandejas	- 30		
Congelación	- 40		0:30
Congelación	- 40		3:00
Prep. Condensador	- 50		0:10
Vacío Cámara		0.200	
Secado primario	- 5	0.200	5:00
Secado primario	10	0.200	8:00
Secado primario	30	0.300	8:15
Secado primario	30	0.300	7:0
Test final secado primario	30	0.300	0:5
Secado secundario	30		4:0
Secado secundario	30		5:0
Test final secado secundario	30		0.5

**Tabla 7: Procedimiento de Liofilización**

### 3.5.1: Determinación de parámetros analíticos

#### 3.5.1.1: Humedad relativa:

La humedad relativa de las muestras liofilizadas, se realizó de acuerdo a la descripción del método de Karl-Fischer; el cual utiliza el reactivo del mismo nombre (originalmente en relación 1:3:10 una mezcla de yodo + dióxido de azufre + piridina en etanol), que al reaccionar cuantitativa y selectivamente con el agua, permite conocer y medir su contenido en la muestra problema. Para ello se empleó un equipo de valoración volumétrica de agua Crison, modelo Compact KF I Titrator (Crison). El procedimiento se realizó sobre la base de los programas definidos por el fabricante:

Nº programa	operación
"20"	estandarización
"16"	titración

y dada la sustitución de la piridina en el reactivo iodosulfuroso R original, por otros compuestos básicos Hydranal (Sigma-Aldrich Química):

- Standard => xileno + butanol
- Tritant => metanol
- Solvent => imidazol, anhídrido sulfuroso, metanol

se procedió conforme a lo indicado en la Real Farmacopea Española (RFE, 1997) a su validación previa, para posteriormente de aplicar los programas "20 y 16", disponer de los datos de humedad relativa de la muestra.

### 3.5.1.2: Contenido proteico:

El contenido proteico fue valorado mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Su fundamento es el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción que sufre el Azul de Coomassie G-250 de 465 a 595 nm, cuando se une a las proteínas. Para ello se empleó el kit “Bio-Rad Protein Assay” (BIO-RAD Lab), que de acuerdo con las instrucciones del fabricante, emplea como recta patrón BSA a diferentes concentraciones (0; 2; 4; 6; 8; 10 µg/mL) sobre la que se compara la muestra y cuyas lecturas se realizan a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Beckman-Coulter DU 640 (Beckman-Coulter).

## 4: IDENTIFICACION DE ALÉRGENOS

### 4.1: Determinación de pesos moleculares. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE)

#### Fundamento teórico

Cualquier molécula cargada se desplaza al ser expuesta en un campo eléctrico. Dado que las proteínas son moléculas con carga neta a cualquier pH distinto del punto isoelectrico, estas migran en un campo eléctrico dependiendo de su densidad de carga (relación entre carga y masa). De este modo, se utiliza esta característica de las proteínas para llevar a cabo su separación.

Actualmente los soportes mas utilizados son los que participan activamente en el proceso de separación al interaccionar físicamente con las partículas de migración (almidón, agarosa, poliacrilamida), cuyo tamaño de poro es el orden del tamaño de las moléculas a separar y que proporcionan, por tanto, la posibilidad de separar proteínas según su carga y tamaño. Entre ellos, el soporte de acrilamida es el que mayores ventajas ofrece: elevada pureza de sus reactivos constituyentes, es químicamente inerte, estable en amplios rangos de pH, temperatura y fuerza iónica, transparente y, además, permite la formación de gradientes precisos.

Los geles de poliacrilamida (abreviada como bisacrilamida), que reacciona con los grupos funcionales libres de las cadenas terminales. El compuesto TEMED cataliza la formación de los radicales libres del persulfato, necesario para que se inicie el proceso de polimerización.

La mayoría de los estudios que emplean electroforesis zonal de proteínas lo hacen mediante el empleo de condiciones desnaturalizantes, de modo que las proteínas son disociadas y analizadas en sus unidades polipeptídicas individuales. Estos métodos, conocidos como electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS PAGE) son ampliamente utilizados y se encuentran muy estandarizados.

#### **4.1.1: Descripción de la SDS PAGE**

Básicamente se emplea el método originalmente propuesto por Laemmli (Laemmli, 1970) con ligeras modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos de electroforesis horizontal utilizados para Mini-Protean II (Bio-Rad).

##### **4.1.1.1: Tampones y soluciones**

Los principales tampones y soluciones se describen a continuación:

###### **1.5 M Tris-HCl; pH: 8.8 (Sepaador)**

Tris base	27.23 g (18.15/100 mL)
Agua destilada	150 mL
Ajuste a pH 8.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C.	

###### **0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8 (Apilador)**

Tris base	6 g
Agua destilada	100 mL
Ajuste a pH 6.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C	

###### **SDS (dodecilsulfatosódico) al 10%**

SDS	10 g
Agua destilada	100 mL

###### **Tampón de tratamiento ("Sample buffer")**

Agua destilada	4 mL
0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
2-β-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.5%	0.2 mL

###### **Tampón de electrodos pH: 8.3 (5X)**

Tris base	9 g (15 g/ L)
Glicina	43.2 g (72 g/L)
SDS	3 g (5 g/L)
Agua destilada	600 mL

Almacenamiento a 4° C y calentamiento a 37° C si se produce precipitación.

Se diluyen 60 mL de tampón stock 5X con 240 mL de agua destilada.

### Solución de Azul de Coomassie (Tinción)\*

Azul de Coomassie R-250	1 g
Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de tinción: 60 minutos a 50° C o 12 horas a temperatura ambiente.

\*si se emplea la tinción propuesta por el fabricante “Biosafe de Coomassie” (Bio-Rad), el gel debe de previamente lavarse 3 veces con agua destilada y añadir posteriormente la tinción, manteniéndola durante 1 hora y desteñir a continuación el gel con agua.

### Solución decolorante

Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de decoloración: entre 1 y 3 horas.

#### 4.1.1.2: Montaje de las placas

De acuerdo a las instrucciones del fabricante del equipo Mini-Protean II dual slab cell.

#### 4.1.1.3: Preparación de los geles: Sistema discontinuo

##### Gel Separador “running gel” (porcentaje de acrilamida 12.5%) => cantidad para 2 geles de 0.75 mm

Acrilamida (40%) 29:1	2.8 mL
Tris HCl 1.5 M pH: 8.8	1.7 mL
Agua destilada	2 mL
SDS 10%	66 µL

Persulfato amónico (fresco)	70 µL (30 mg/mL) => 3%
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	14 µL
Cantidad por placa	3.2 mL
Tiempo de polimerización	10 minutos
INTERFASE: 40 µL de Butanol/agua por cada lado de la placa	

\* El porcentaje de acrilamida se establece en función del peso molecular de la muestra que es objeto de estudio. Se utiliza un porcentaje de acrilamida del 12,5% cuando la muestra tiene un peso molecular relativo que oscila entre los 15 y los 95 kDa. Cuando la muestra tiene un peso molecular mas elevado se reduce el porcentaje de acrilamida, superando siempre el porcentaje establecido para el gel preparador, y cuando el peso molecular es inferior al anteriormente señalado se aumenta dicho porcentaje.

El grosor del gel se ajusta en proporción a la cantidad de proteína que pongamos, utilizando para este fin cristales diseñados para este uso

### **Gel Apilador o Concentrador “stacking gel” (porcentaje de acrilamida 4%) => cantidad para 2 geles de 0.75 mm**

Acrilamida	0.7 mL
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	1.7 mL
Agua destilada	4.2 mL
SDS 10%	66 µL

desgasificación 10 minutos => Polimerización:

Persulfato amónico (fresco)	70 µL
Tetrametilendiamina (TEMED)	14 µL

#### **4.1.1.4: Preparación de las muestras**

Las muestras se disuelven en el tampón de muestra, a una concentración de unos 0,5 a 2 mg/mL de proteína calculada según el método Bradford (Bradford, 1976), llevándose a una temperatura de 100° C durante 5 minutos. Tras su enfriamiento, los restos insolubles se eliminan por centrifugación a 14.000 r.p.m, en una centrifuga Micro (Helltich) durante 5 minutos, descartándose el precipitado.

El patrón de pesos moleculares se recompone así mismo en el tampón de muestra, debiendo previamente a su empleo haber alcanzado los 100° C durante 5 minutos.

#### **4.1.1.5: Condiciones electroforéticas**

Tras el rellenado de la cubeta interior con el tampón de electroforesis y añadiendo el resto a la cubeta; se dispensa el patrón y las muestras en las calles con una pipeta en un volumen de 10 µL.

La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 200 voltios durante 30 – 45 minutos, en función del frente de migración que presenta el azul de bromofenol. En ese momento se desconecta la fuente y se extrae el gel de entre las dos placas.

#### **4.1.1.6: Tinción**

El gel se coloca en una placa de Petri y se añade la solución colorante de Coomassie, en dos protocolos:

- Rápido: 1 hora a 60 °C
- Lento: 24 horas a temperatura ambiente



El exceso de colorante es retirado mediante la solución decolorante hasta que el fondo del gel quede casi transparente (1 – 3 horas) y puedan ser visualizadas adecuadamente las bandas del patrón y de las muestras.

### 4.1.1.7: Determinación de Pesos Moleculares

Se realiza de acuerdo al método propuesto por Weber y Osborn (Webber, 1969), construyendo una recta de calibrado, que representa la movilidad (en mm) de una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular (PM conocido). La movilidad se mide desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda.

Una vez demostrada la correlación entre ambas variables ( $r > 0.90$ ), el peso molecular de las proteínas o péptidos de la muestra problema se determina a partir de sus movilidades.

Las proteínas empleadas como patrones, cuando se utilizaron geles al 12,5% de acrilamida fueron adquiridas a Amersham biosciences, referencia 17-0446-01 correspondientes a unos estándares de pesos moleculares, que se especifican en la tabla siguiente:

Amersham biosciences referencia 17-0446-01	
Proteínas	Pesos moleculares (kDa)
Fosforilasa b	97.0
Seroalbúmina bovina	66.0
Ovoalbúmina	45.0
Anhidrasa carbónica	30.0
Inhibidor de tripsina	20.1
Lisozima	14.4

**Tabla 8: Estándares de pesos moleculares.**

## 4.2: Transferencia de bandas proteicas, separadas por electroforesis a membranas Inmovilizantes. Western blot

### Fundamento teórico:

El proceso se define como la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a un filtro (matriz o membrana de inmovilización) que puede ser sometido a los tratamientos necesarios para la identificación de las bandas. Esto lleva consigo las siguientes ventajas :

- a) Los filtros son más manejables y flexibles.

- a) Las proteínas inmovilizadas son fácilmente y por igual accesibles a varios ligandos (ya que se obvian las limitaciones introducidas por la porosidad de los geles de gradiente)
- b) Generalmente se requieren menores cantidades de reactivos.
- c) Los tiempos de los procesos (incubaciones y lavados) se reducen significativamente.
- d) Se pueden hacer múltiples replicas del mismo gel.
- e) Las transferencias se pueden guardar durante periodos de tiempo considerables.
- f) La misma transferencia se puede utilizar para múltiples análisis sucesivos.
- g) Y lo más importante de todo, la transferencia es susceptible de análisis que de otra forma serían muy difíciles o imposibles de efectuar en los geles.

Las membranas pueden ser de diferentes tamaño de poro: 0,45  $\mu\text{m}$ ; 0,22  $\mu\text{m}$  (son los mas habituales). A poro más pequeño hay más retención de proteína (conveniente cuando se trabaja con moléculas de bajo peso molecular) pero dificulta o limita la interacción de los anticuerpos.

La unión proteica a la membrana no es covalente, por lo tanto, es probable que con los sucesivos pasos del protocolo (bloqueo, lavados...) se pierda una proporción significativa de la proteína retenida a la membrana. Algunos materiales parecen presentar ventajas sobre otros; por lo que si esto presenta un problema en los experimentos se pueda probar con membranas de difluoruro de polivinilideno, como por ejemplo Hybond (Amersham biosciences (PVDF) que presentan una mayor capacidad de adsorción y fijación de proteínas, que las convencionales de nitrocelulosa y/o nylon.

### **4.2.1: Descripción. Inmunotransferencia (Western blot)**

Es el procedimiento mas utilizado actualmente para la transferencia. La inmunotransferencia se basa en la electroelución de las proteínas del gel. Esto es posible por el hecho de que las proteínas (en contraste con el DNA) se adsorben a la membrana, incluso en tampones de baja fuerza iónica. Por lo tanto, se pueden electroeluir las proteínas fuera del gel hacia los filtros en condiciones que no necesitan corrientes eléctricas impracticablemente altas. Hay que hacer constar que la electroelución de macromoléculas para la inmunotransferencia fue usada por primera vez por Arnheim y Southern en 1977.

El tampón de transferencia más común es el descrito por Towbin y cols (1979): Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%. El metanol inhibe el hinchamiento del gel y mejora la resolución de la inmunotransferencia, pero estos porcentajes pueden producir que se elimine el SDS de las proteínas llegando a precipitar en gel. Esto no es problema en el caso de las proteínas pequeñas, pero en el caso de que se quieran transferir proteínas con un punto isoelectrico alcalino o un peso molecular de más de 100 kDa se recomienda reducir el contenido en metanol (a menos de 10%). También se puede añadir SDS a la solución de transferencia.

Las proteínas pequeñas (<20 kDa) normalmente transfieren bien independientemente de los porcentajes de metanol. Sin embargo se deben tener en cuenta las siguientes precauciones:

- Limitar el tiempo en el tampón de transferencia (menos de 10 min.) porque pueden migrar rápidamente sin fuerza iónica.
- Para evitar la perdida a través de la membrana (Blow-trough): Tampón de transferencia con 20% de metanol que aumenta el tabicamiento (partitioning) de la proteína a la membrana.
- Reducir la intensidad de corriente a la mitad para que haya más tiempo para interaccionar con la membrana.

En resumen cuando la proteína a transferir es grande se debería migrar la muestra en geles de acrilamida de bajo porcentaje, reducir la cantidad de metanol, aumentar la intensidad de corriente y transferir durante más tiempo. Cuando la proteína es pequeña, metanol al 20%, menos carga y menos tiempo de transferencia.

Para proteínas grandes y básicas se puede utilizar un tampón de transferencia compuesto de CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico) 10 mM y metanol 5%-10% pH 10,5-11 (Matsudaria, 1987).

Para transferir geles nativos se debe eliminar por completo el metanol del tampón de transferencia

El empleado en estos experimentos es el método descrito por Towbin (Towbin y cols., 1979), en un equipo de transferencia Bio-Rad compuesto por:

- Mini Trans-blot electrophoretic transfer cell.
- Mini Protean II cell ó Trans-blot semi-dry transfer cell.
- Power Pac 200

### 4.2.2: Método de transferencia semiseco

- a) Preparación del Tampón de Transferencia (Schafer-Nielsen y cols., 1980) compuesto por:

Glicina 39 mM	5.82 g
Tris 48 mM	2.93 g
SDS 1.3 mM	3.75 mL al 10%
Metanol 20% (v/v)	200 mL
Agua destilada completar hasta	1 L

pH del tampón 9.2; que nunca debe de ajustarse con ácidos o bases y puede almacenarse a 4° C.

- b) El gel de poliacrilamida, una vez finalizada su electroforesis, debe de ser equilibrado para retirar las sales y restos de detergente, que incrementarían la conductividad de la transferencia. Para ello el gel de poliacrilamida debe de sumergirse en el tampón de transferencia durante al menos 10 minutos; siempre que su grosor sea de 0.75 mm. Si el gel fuera mas grueso el tiempo seria mayor.
- c) La membrana de PVDF y el papel de filtro protean KL size (ref. 1147NF3 Bio-Rad), deben de cortarse 1 o 2 cm mas grande que el gel de poliacrilamida. Dadas las características hidrófobas de la membrana de PVDF, debe de someterse a un pretratamiento de:

Metanol	15 segundos
Agua destilada	1 minuto
Tampón de Transferencia	>2 minutos

- d) Colocación de los componentes de la transferencia en la placa del aparato:  
En primer lugar el papel de filtro Protean XL size (ref. 1147NF3 Bio-Rad), embebidos en el Tampón de Transferencia. La membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y otro de papel de filtro.
- e) La transferencia se lleva a cabo mediante la aplicación de un voltaje entre 10 – 15 V (3 mA/cm<sup>2</sup>) y nunca excederá de 25 V. Este valor se obtiene tras la medida del área del gel, que al multiplicarse por la constante 5.5 y dividirse por 1.000, nos indica el número de mA requeridos. El tiempo aproximado de transferencia no debe ser superior a los 45 minutos.
- f) Una vez finalizado el proceso de transferencia, se retira la membrana de PVDF, bien para ser teñida o procesada para inmunodetección

### 4.2.2.1: Tinción de membranas de PVDF transferidas: directa

- a) Solución de tinción Negro Amido (Amido Black 10 B; Panreac, al 0.1%):

Amido Negro 10 B	0.2 g
Solución decolorante	200 mL

b) Solución decolorante:

Metanol	900 mL
Ácido acético glacial	20 mL
Agua destilada	80 mL

Se coloca la membrana de PVDF en la solución de tinción durante 10 minutos y posteriormente se traslada la misma a la solución decolorante, hasta que el fondo quede claro. Retiramos en ese momento la membrana y la dejamos secar.

#### 4.2.2.2: Tinción de membranas de PVDF transferidas: reversible

Las membranas pueden así mismo teñirse con la solución de Ponceau, para ello deberán de sumergirse en una solución al 0.5% de rojo Ponceau, 1% de ácido acético durante un minuto y ulterior desteñido con agua destilada hasta conseguir un contraste óptimo. La tinción puede retirarse completamente con una solución de hidróxido sódico 0.1 N.

#### 4.2.2.3: Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana de PVDF

Se procedió de acuerdo al protocolo de Shen (Shen, 1988), con ligeras modificaciones:

- Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, la membrana de PVDF se corta en las diversas calles que van a ser incubadas individualmente.
- Se procede a un proceso de saturación de la membrana, para evitar las uniones inespecíficas de las inmunoglobulinas o de los conjugados inmunoglobulina – enzima. Para ello, la membrana de PVDF se incubó bien con tampón PBS-Tween 0.1%, bien con BSA 1% PBS-Tween 0.05%, o bien con PBS-leche 3% dependiendo del anticuerpo utilizado, durante 1 hora, en agitación suave y a temperatura ambiente.
- Los restos del Tampón de saturación, son eliminados mediante 4 lavados con Tampón PBS de 5 minutos, en agitación constante y a temperatura ambiente.
- La incubación de las membranas de PVDF, con el suero de los pacientes, se realiza durante un periodo de 12 – 16 horas, en agitación constante y a una temperatura de 4° C. Los sueros de los pacientes, pueden emplearse individualmente o agrupados “pool”. A nivel de IgE individualizados, los sueros se emplearon sin diluir (sueros de clase  $\geq$  III en RAST o equivalente). Cuando se emplean agrupados, se procedió a diluciones 1:2, 1:5 y 1:10.

Cuando el anticuerpo reconocedor de los antígenos es una IgG procedente de un conejo inmunizado contra dicho antígeno, las diluciones dependen del título. En este caso el antisuero de conejo frente a Der p 1 y Der p 2, se utilizó a diluciones 1:5.000 - 1:10.000.

Tras la incubación con el suero, los anticuerpos no fijados se eliminan mediante 4 lavados de 5 minutos con Tampón PBS, en condiciones de agitación constante y a temperatura ambiente.

- e) La adición del conjugado anti IgE humana marcada con peroxidasa de rábano (HRP-anti Ig E Dakopatts (ref. P 295) o HRP anti IgE Biosource (ref. AH10509), diluida previamente 1:5000 en Tampón PBS-Tween 0.1%; a la membrana de PVDF en un volumen suficiente que la cubra, se realizó manteniéndose durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente.

La utilización de un anticuerpo secundario biotinilado se produjo cuando era necesario aumentar la sensibilidad del experimento. Para ello se utilizó una anti IgE biotinilada Biosource (ref. AH10509) diluida 1:10.000 en PBS-Tween al 0.1% para los sueros de pacientes sensibilizados; y una anti IgG de conejo biotinilada (Jackson immunoresearch Laboratorios, Inc, Pensilvania, EU (ref 711-065-152)) diluida 1:10.000 en tampón BSA al 1% PBS -Tween 0,05% para los antisueros de conejo frente a Der p 1 y Der p 2. Ambos anticuerpos se incuban junto con la membrana durante 1 hora, con agitación y a temperatura ambiente.

- f) Los conjugados no fijados fueron eliminados, mediante 4 lavados con Tampón PBS, de 5 minutos de duración, en agitación y a temperatura ambiente.
- g) Las membranas que han recibido una incubación con anticuerpos unidos a biotina, se incuban con Estreptavidin-peroxidasa (Sigma S5512) a una dilución 1:1000 de la solución stock que se encuentra a 1 mg/mL, durante 30 minutos

El revelado del inmunocomplejo se realizó empleando el sistema ECL + Plus. Western Blotting detection reagents, ref. NEL104 de Perkin Elmer (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA); mediante el siguiente protocolo:

- a) Extraer los reactivos de la cámara fría y mantenerlos a temperatura ambiente unos minutos antes de su utilización.
- b) Mezclar las soluciones etiquetadas como A y B inmediatamente antes de su uso en una proporción de 1:1. y toda la superficie de la membrana debe de ser cubierta.

- c) El exceso de tampón de lavado se retirará y la membrana debe de colocarse sobre una superficie limpia (un buen soporte es emplear un trozo vidrio); siempre manteniendo el lado que contiene las proteínas adsorbidas hacia arriba.
- d) Retirar el exceso de la mezcla de detección. Es recomendable realizarlo sosteniendo la membrana en posición vertical y dejando así que escurra el líquido. El extremo inferior de la membrana deberá de estar en contacto con un papel secante, con el fin de eliminar el líquido acumulado en el borde inferior.
- e) La membrana debe de colocarse inmediatamente después sobre un pliego de plástico transparente; con la cara que lleva las proteínas adsorbidas hacia arriba, cuidando de retirar muy suavemente las burbujas de aire, que se puedan producir entre el plástico y la membrana. Evitar fundamentalmente la presión sobre la misma.
- f) La membrana envuelta en el plástico con el lado que porta las proteínas adsorbidas hacia arriba, se coloca dentro del cassette de revelado (Hypercassette Amersham Life Science código RPN 13642). Debe de asegurarse que el cassette está totalmente seco. No deben de existir restos de reactivos humedeciendo la cassette, con el fin de reservar la ausencia de humedad en la película.
- g) En habitación oscura con luz roja de seguridad, colocamos una película de autorradiografía MXG film de Kodak, 100 MIF, 18 x 24 cm (código 525 3356), encima de la membrana. Cerrar el cassette y exponer durante 15 segundos, cuidando de no mover la película durante la exposición. Tras el tiempo de exposición retiramos la película expuesta y colocamos otra sin exponer encima de la membrana. La primera película debe de ser revelada inmediatamente y en función de su resultado, podremos estimar el tiempo que debe de mantenerse en exposición la segunda de las películas, que puede variar entre 1 minuto y 1 hora. Si el tiempo de exposición necesario es menor de 5 segundos, se recomienda diluir los anticuerpos, dada la dificultad de controlar tiempos de exposición tan cortos.

### **4.3: Procedimiento de evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección**

El peso molecular y la intensidad de las distintas bandas pueden ser evaluadas mediante un sistema de tratamiento de imagen, en base al empleo de un densitómetro Bio-Rad, Calibrated Imaging Densitometer GS 710; equipado con un sistema específico de análisis de imagen Bio Rad Diversity Data Base. Mediante éste equipo podemos obtener las imágenes de los geles de electroforesis de poliacrilamida o de las membranas de PVDF y su “escaneo” e integración de datos, nos permite conocer los pesos moleculares de cada banda en función de sus movibilidades comparadas respecto del patrón o estándar empleado, haciendo un análisis de regresión lineal entre las variables

logaritmo del peso molecular y logaritmo de la movilidad, medido en “pixels”, exigiéndose una correlación  $r > 0.90$  entre ambas variables.

En un aspecto semicuantitativo, la intensidad de cada calle o banda puede ser representada como expresión del resultado en intensidad integrada de imagen (densidad óptica por  $\text{cm}^2$ ).

### **5. COMPROBACIÓN DE SIMILITUD CON PROTEÍNAS NATIVAS**

Para constatar la similitud de las proteínas nativas con las recombinantes se realizaron técnicas de inmunotransferencia y de ELISA.

Mediante la inmunotransferencia se comprobó el reconocimiento de los sueros en proteínas desnaturalizadas, aportando además datos sobre su peso molecular (debido a la separación electroforética en geles SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Towbin y cols., 1979).

Mediante la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) se estudio el reconocimiento de la proteína sin desnaturalizar.

### **6. USO DE ANTICUERPOS PARA LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NATIVAS.**

Usamos cromatografía de afinidad tanto en columnas de Agarosa/Sefarosa activada con bromuro de cianógeno en las que se han unido inmunoglobulinas (Hermanson y cols., 1992), o bien Sefarosa-proteína A en la los anticuerpos quedan orientados con los sitios de unión al antígeno hacia fuera y a la vez la unión de la inmunoglobulina se hace covalente (Venturi y cols., 2000). Esto último se logra gracias al DSS, Disuccinimidil suberato, que es un compuesto insoluble en agua no divisible (‘non-cleavable’) que inmoviliza moléculas a través de las aminas primarias formando un enlace amida covalente. En proteínas sólo las  $\epsilon$ -amina de la lisina reaccionan significativamente con los ésters-NHS. La pureza del alérgeno así obtenido suele ser elevada, pero en cualquier caso se pueden realizar cromatografías adicionales de tamizado molecular y/o intercambio iónico (AKTA purifier).

#### **6.1: Purificación de anticuerpos por columnas de proteína A y biotinilización**

##### **6.1.1: Materiales y reactivos**

- Tampón de unión:  
Tampón fosfato salino
- Tampón de lavado:  
Tampón fosfato salino



- Tampón de elución:  
Glicina 50 mM, pH 2.5  
NaCl 0.15 M

Trietanolamina 50 mM, pH 11  
NaCl 0.15 M

### 6.1.2: Desarrollo

- a) La columna (Poly-Prep Chromatography column cat # 731-1550, Bio-Rad) se rellenó con aproximadamente 1.8 mL de solución de proteína A (p 6649, Sigma) que tiene una afinidad por mL, de 5.5 mg de IgG humana (en este caso queremos unir IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 de conejo), lavándola a continuación con unos 10 mL de tampón de lavado para retirar el diluyente en el que se encuentra la proteína A.
- b) El antisuero (conteniendo IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 de conejo) se diluyó en una proporción 1:1 en tampón de unión (en esta primera aproximación se desconocía la cantidad de IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 de conejo que contenía el suero) y se añadió al interior de la columna dejándolo en agitación orbital, durante 1 hora.
- c) El eluido se recogió sobre un tubo que se rotuló como fracción "Not Bound" (que es la parte no unida a la proteína A) y a continuación se lavó con unos 15 mL de tampón de lavado y se midió la absorbancia a 280 nm para comprobar la cantidad de proteína presente
- d) Con el propósito de obtener el anticuerpo IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 de conejo separado del resto de los componentes del antisuero se añadieron unos 2 mL de tampón de elución, pH 4.0, recogiendo el contenido sobre un tubo al que se le añadieron previamente 200  $\mu$ L de Tris HCl 1 M, pH 8.0 para amortiguar el pH.

Después se repitió esta acción con el tampón de elución de pH 3.0 y por último con el de pH 2.5.

- e) El contenido en proteína de estos 3 tubos nos daba una relación del rendimiento obtenido. Debido a esta razón se midieron los contenidos en proteína de cada tubo por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Beckman-Coulter DU 640 (Beckman-Coulter) para ver la cantidad de proteína que se obtenía de cada elución; y las absorbancias obtenidas, se dividieron por 1.38 que es el coeficiente de absorbancia (1 mg/mL) para la IgG a 280 nm.
- f) Con el mismo propósito se prepararon muestras para analizar estas eluciones por SDS PAGE para comprobar el grado de purificación de la IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2.

- g) A continuación se dializaron las muestras contra PBS, con tubos concentradores Vivaspin (Sartorius) que tienen un tamaño de poro de 10 kDa. El volumen inicial se redujo a la cuarta parte incrementando así la estabilidad al elevar la concentración de la muestra.

### 6.2: Biotinilización

A partir de las inmunoglobulinas purificadas del antisuero de conejo  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2.

#### 6.2.1: Materiales y reactivos

Solución hidracida de biotina, Pierce (EZ-LINK™ Biotin Hydrazide).

La solución hidrazida de biotina 50 mM se preparó justo antes de su uso: 5 mg en 300  $\mu$ L de DMSO.

Tampón de acoplamiento:

Tampón de acetato sodico 0,1 M, pH 5.5

Ácido acético 3 mL

Acetato sódico 4,1 g

Agua 1 L

Las inmunoglobulinas de conejo IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2:

Aproximadamente 2 mg/mL de IgG en tampón de acoplamiento (se midieron 1,6 mg/mL a 280 nm)

Solución de meta-periodato sodico (Sigma):

Solución de meta-periodato sodico 20 mM en tampón de acoplamiento que se preparó fresco y se guardó en oscuridad.

Glicerol (Glicerol 99%. SIGMA)

#### 6.2.2: Desarrollo

- Se añadió 1 mL de solución de meta-periodato sódico frío a 1 mL de solución de IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 frío y se mezcló bien y a continuación se mantuvo dicha mezcla 30 minutos a 0°C y en oscuridad para que tuviera lugar la reacción de oxidación.
- El glicerol se añadió a una concentración final de 15 mM (2,2  $\mu$ L de glicerol 99% Sigma), se mezcló y se incubó durante 15 minutos a 0°C para detener la oxidación.
- La muestra se dializó frente a tampón de acoplamiento con tubos concentradores de un poro de 10 kDa, Vivaspin, (Sartorius).

- d) La solución de hidracida de biotina se añadió a la muestra dializada a una concentración final de 5 mM y se dejó en agitación durante 2 horas y a temperatura ambiente.
- e) La muestra se dializó contra PBS para separar las moléculas biotiniladas del material que no ha reaccionado y se guardó a 4°C.

### 7. UNIÓN DE IgG A LA MATRIZ DE PROTEÍNA A-SEFAROSA

Con la intención de aislar los alérgenos Der p 1 y Der p 2 del resto de componentes del extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus*, se utilizaron los anticuerpos IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 como fuente de unión por cromatografía de afinidad por su especificidad para unirse a los citados alérgenos Der p 1 y Der p 2. De ahí que en primer lugar se produzca la unión de estos anticuerpos a la proteína A situada en el interior de la columna y fijemos dicho anticuerpo a la matriz mediante un enlace covalente

#### 7.1: Materiales y reactivos

- Tampón de unión.  
Tampón fosfato salino
- Tampón de lavado.  
Tampón fosfato salino
- Tampón de elución  
  
Glicina 50 mM, pH 2.5  
NaCl 0.15 M  
  
Trietanolamina 50 mM, pH 11  
NaCl 0.15 M

#### 7.2: Desarrollo

- a) La columna (Poly-Prep Chromatography column cat # 731-1550, Bio-Rad) se rellenó con aproximadamente 1.8 mL de solución de proteína A (p 6649, Sigma), lavándola a continuación con unos 10 mL de tampón de lavado para retirar el diluyente en el que está la proteína A.
- b) Los antisueros (conteniendo IgG  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 de conejo) se diluyen en una proporción 1:1 en tampón de unión y se añaden al interior de la columna dejándolo en agitación orbital, durante 1 hora.
- c) El contenido se recogió sobre un tubo que se rotuló como fracción "Not Bound" y a continuación se lavó con unos 15 mL de tampón de lavado.

### 7.3: Reactivos Cross-linking

DMSO [Dimetilsulfoxide] (Sigma) para usar con DSS [Disuccimidyl suberate] (Sigma S-1885), que es el agente “crosslinkante”

- Tampón de conjugación: Se usan tampones que no contengan grupos aminos: Tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4
- Tampón de parada: Tris HCl 1 M, pH 8

### 7.4: Desarrollo:

- a) Se pesaron 2 mg de DSS (polvo) sobre un tubo Eppendorf y se disolvieron sobre 216  $\mu$ L de DMSO para obtener una solución stock 25 mM.
- b) La cantidad de cross-linker que se añadió, guardó relación con los moles de IgG, así para muestras de 5 mg/mL se añadieron entre 20 y 50 veces la molaridad del anticuerpo.
- c) Si la IgG tiene una masa molecular de aproximadamente 150 kDa y el peso es de 5 mg ( $5 \cdot 10^{-3}$  g), siendo el volumen aproximadamente de la solución de proteína A añadido a la columna, de 1,2 mL ( $1,2 \cdot 10^{-3}$  L), la molaridad será de 27.7  $\mu$ M.
- d) Si debemos superar en 20-50 veces esta molaridad (40 veces) la molaridad a utilizar de DSS en DMSO es de aprox. 1 mM. Que es 1:25 partes de la solución stock que habíamos preparado, es decir, 60  $\mu$ L de DSS 25 mM en 1.5 mL de PBS pH 7.4.
- e) Estos 1.5 mL se pusieron en la columna y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos (2 horas a 4°C).
- f) Se retiró el contenido y se añadió 1 M Tris HCl pH 8 para “apagar” la reacción durante 15 minutos a TA.
- g) Se Pasó tampón PBS para lavar la columna.

## 8. PURIFICACIÓN DE ALÉRGENOS GRUPO 1 (Der p 1), GRUPO 2 (Der p 2)

### 8.1: Desarrollo

- a) Las columnas “crosslinkada” con  $\alpha$ -Der p 1 y Der p 2 se rellenaron con aproximadamente unos 10 mL de tampón de lavado para retirar el diluyente en el que esta la proteína A.
- b) El extracto alergénico de *Dermatophagoides pteronyssinus*, se reconstituyó en unos 5 mL de tampón de unión y se añadió al interior de la columna dejándolo en agitación orbital durante 1 hora.

- c) El eluido se recogió sobre un tubo que rotulamos como fracción “Not Bound” (la parte no unida a la proteína A o no retenida por la proteína A).
- d) Se lavo la columna con unos 15 mL tampón de lavado y se chequeó el contenido de proteína a 280 nm
- e) Se eluyó con unos 2 mL de tampón de elución, pH 2.5, y se chequeó el contenido de proteína a 280 nm.
- f) Existe otra opción que es eluir a pH alcalino con trietanolamina a pH 11
- g) Medimos a 280 nm

### 9. ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)

#### Fundamento teórico

Los enzimoimmunoensayos (EIA) son técnicas inmunológicas que emplean reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), en las que el marcaje de los mismos se realiza con enzimas. Así, a la reacción inmune sigue una reacción indicadora (normalmente con aparición de color) en la que se determina fotométricamente la actividad del enzima marcador.

El ELISA es un tipo de enzimoimmunoensayo heterogéneo [la actividad del enzima es la misma tanto si esta formando parte del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac, inmunocomplejo) como si no], en el que la aparición de las dos fracciones se consigue gracias al uso de soportes sólidos a los cuales se adhiere el complejo Ag-Ac, eliminándose el reactivo marcado libre mediante lavados.

En el ELISA que se ha venido utilizando el enzima (peroxidasa de rábano picante, HRP) esta conjugado a un anticuerpo que reconoce a toda inmunoglobulina de unas características determinadas, que a su vez se ha unido a una placa de microtitulación.

#### 9.1: Cuantificación Grupos 1: Der p 1 y 2: Der p 2. ELISA doble sándwich

- a) Los alérgenos de los Grupos 1 y 2 de ácaros que se utilizan como patrón o recta de calibración se obtienen mediante cromatografía de afinidad y se encuentra almacenado como soluciones stock a 0.2 mg/mL en PBS + Thimerosal (0,02%). Los anticuerpos que se usan en esta determinación son policlonales monoespecíficos de conejo anti Der p 1 y anti Der p 2 (etiquetados como Ab anti Der p 1 y Ab anti Der p 2)
- b) En placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018), se activan con 100 µL de una solución de anticuerpo, IgG anti Der p 1 o

- c) anti Der p 2 de conejo purificada por una columna de proteína A, a 2  $\mu\text{g/mL}$  en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6, toda la noche a 4°C. Esto es una dilución 1/100 del stock de anticuerpo (por ejemplo, 100  $\mu\text{L}$  en 10 mL). Por lo tanto, la concentración de IgG por pocillo será de (0,2  $\mu\text{g}$  = 200 ng).
- d) Al día siguiente los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200  $\mu\text{L}$ /pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- e) La placa se incuba durante 1 hora con 200  $\mu\text{L}$  de BSA al 1% en PBS-T al 0.05% a temperatura ambiente.
- f) Los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200  $\mu\text{L}$ /pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- g) A cada pocillo se le añaden 50  $\mu\text{L}$  de muestra de alérgeno diluido y se incuban durante 1 hora. Se emplean Der p 1 (Vial DIATER etiquetado como Der p 1 estándar de 10  $\mu\text{g/mL}$ ) o Der p 2 (Vial DIATER etiquetado como Der p 2 estándar de 10  $\mu\text{g/mL}$ ), de forma que la curva control se encuentre en un rango de concentración que empieza en 25 ng/mL (1/400 en dilución del stock), hasta aproximadamente 0.5 ng/mL de Der p 1 o Der p 2 de la siguiente manera:
  - f.1) La primera dilución (lleva 400  $\mu\text{L}$  totales) se mezclará bien y se transferirán 200  $\mu\text{L}$  de esta primera a través de una serie de tubos Eppendorf que contienen 200  $\mu\text{L}$  de BSA al 1% en PBS-T al 0.05% para hacer diluciones seriadas. Utilizaremos 50  $\mu\text{L}$  por pocillo para un total de 3 réplicas para cada dilución (es decir, empleamos un total de 150  $\mu\text{L}$ ). Los pocillos control o blanco deben incubarse solamente 1% de BSA en PBS-T al 0.05% (solución de bloqueo).
  - f.2) La muestra problema se prepara en diluciones tales, mejor varias diluciones empezando por 1:1.000 hasta 1:16.000, por ejemplo, que previsiblemente tengan concentraciones de alérgeno mayor que se encuentren dentro de la curva patrón (es decir, por debajo de 25 ng/mL y por encima de los 0.5 ng/mL). Obviamente estas diluciones de la muestra problema son puramente empíricas, y es posible que haya que repetir el experimento con diluciones mayores o menores que nos sirvan para realizar una estimación certera del alérgeno que pretendemos cuantificar, bien Der p 1 o bien Der p 2.
- h) Los pocillos se lavan 3 veces con 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de PBS-T al 0.05% y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- i) La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo policlonal biotinilado, tal como se describió en el apartado 6.2.2 (viales DIATER etiquetados como Ab anti Der p 1 biotin o como Ab anti Der p 2 biotin) a una dilución 1/1000 en BSA al 1% en

PBS-T al 0.05%. Estos anticuerpos se utilizan como parte superior del “sándwich”.

- j) Los pocillos se lavan 3 veces con 200  $\mu$ L/pocillo de PBS-T 0.05 % y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- k) Se incuban a continuación con 100  $\mu$ L de una dilución 1/1.000 de Estreptavidin-peroxidasa (Sigma S5512. Los 0,25 mg que contiene el vial se reconstituyen en 1 mL de agua destilada), durante 30 minutos a temperatura ambiente. La dilución de la Estreptavidina-peroxidasa se recomienda realizarla en 1% de BSA en PBS-T al 0.05%.
- l) Se lavan los pocillos 3 veces con 200  $\mu$ L/pocillo con PBS-T al 0.05% y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- m) A cada pocillo se le añaden 100  $\mu$ L de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive; Sigma T 4444, normalmente diluido 1:1 con H<sub>2</sub>O). La reacción de color azulado se mide a 650 nm, pero si se añade un volumen igual de ácido sulfúrico 2 N la reacción colorimétrica se para y el color vira a amarillo. La lectura entonces de los valores de absorbancia de la reacción ya parada (amarillo) se consigue en una longitud de onda de 450 nm, y los valores son siempre superiores a los de la reacción de la solución de TMB sin detener.
- n) Las absorbancias de cada pocillo fueron obtenidas tras la lectura de las placas en un lector Multiskan Acent V1.23.

Las lecturas de absorbancia son directamente proporcionales a las cantidades de Der p 1 o Der p 2 unidos y los valores se extrapolan de la respectiva curva patrón.

### 9.2: ELISA directo: Grupo 1 (Der p 1) y Grupo 2 (Der p 2).

- a) Los alérgenos en fase sólida lo constituyen los anticuerpos  $\alpha$ -Der p 1 ó Der p 2 que se encuentran acoplados a una placa microtiter de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018. a una concentración de 200 ng/pocillo.
- b) La placa se mantiene toda la noche incubando a 4°C
- c) A cada pocillo se le añadieron 100  $\mu$ L de una solución de bloqueo formada por BSA 1% PBS-Tween 0,05% y se mantuvo con dicha solución durante 1 hora.
- d) Los alérgenos Der p 1 y Der p 2 fueron colocados en los pocillos de la placa siguiendo un diseño. Se hicieron 2 replicas por cada suero (pacientes sensibles a *Dermatophagoides pteronyssinus* de clase  $\geq 3$ ) y 4 replicas para el pool de estos sueros. La cantidad que se empleó en

cada pocillo de Der p 1 y Der p 2 fué de 25 ng. La placa se dejó en agitación y a temperatura ambiente 1 hora.

- e) Tras los 3 lavados con PBS-Tween 0.05% y el secado correspondiente, se pusieron 50  $\mu$ L/pocillo de suero correspondiente a cada paciente por cada 2 pocillos, y se dejaron en agitación durante 1 hora y a temperatura ambiente.
- f) Tras el lavado por 3 veces de cada pocillo con PBS-Tween 0,05%, se seco la placa y se procedió a la adición de 50  $\mu$ L de una anti IgE humana obtenida en cabra (Biosource cat. AHI0501) a una dilución 1:2.000, en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente
- g) Tras nuevos lavados con PBS-Tween 0,05%, se procedió a la adición de 50  $\mu$ L de una anti IgG de cabra biotinilada a una dilución 1:5.000 (Jackson ImmunoResearch; cat. 705-065-147) en solución de bloqueo durante también 1 hora a temperatura ambiente.
- h) Tras lavados posteriores y adición de una dilución 1:1.000 de Estreptavidina-peroxidasa (Sigma cat. S5512) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.
- i) Finalmente se lavó la placa con 100  $\mu$ L y se reveló 100  $\mu$ L de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive; Sigma T 4444, normalmente diluido 1:1 con H<sub>2</sub>O). La reacción de color azulado se mide a 650 nm, pero si se añade un volumen igual de ácido sulfúrico 2 N la reacción colorimétrica se para y el color vira a amarillo. La lectura entonces de los valores de absorbancia de la reacción ya parada (amarillo) se consigue en una longitud de onda de 450 nm, siendo los valores son siempre superiores a los de la reacción de la solución de TMB sin detener.
- j) Las absorbancias de cada pocillo fue obtenida tras la lectura de la placa en un lector Multiskan Acent V1.23.

### 9.3: ELISA inhibición

- a) El alérgeno en fase sólida lo constituyen los componentes del extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus*, que se encuentran acoplados a placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018. a una concentración de 250  $\mu$ g/mL. La placa se mantiene toda la noche incubando a 4°C.
- b) Al día siguiente se descarta el contenido y se realizan 3 lavados con PBS-Tween 0,05%



- c) Los alérgenos inhibidores en fase líquida, lo constituyen los componentes del extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p 1, Der p 2. Como control negativo se utilizó el tampón de incubación.
- d) Los sueros empleados corresponden a pacientes con IgE específica a *Dermatophagoides pteronyssinus* de clase  $\geq 3$
- e) El método que se empleó, consiste en la preparación de una batería de diferentes concentraciones de las soluciones de los alérgenos inhibidores en tampón de incubación, sobre el siguiente banco:

*D. pteronyssinus*: 10000, 3330, 1110, 370, 123, 41, 13.7, 4.6  $\mu\text{g/mL}$

Der p 1 : 10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.041, 0.0137, 0.0046  $\mu\text{g/mL}$

Der p 2 : 30, 10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.041, 0.0137  $\mu\text{g/mL}$

- f) En cada tubo se pusieron 200  $\mu\text{L}$  de suero 200  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones del alérgeno inhibidor, excepto en un tubo, en el que sólo se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de tampón de incubación y 200  $\mu\text{L}$  de BSA que es el 100% de unión (0% de inhibición)
- g) Los tubos una vez tapados son preincubados a temperatura ambiente durante 3 horas y en agitación orbital.
- h) A cada pocillo se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de bloqueo formada por BSA 1% PBS-Tween 0,05% y se mantuvo con dicha solución durante 1 hora.
- i) Pasadas las 3 horas de preincubación se pusieron en cada uno de los pocillos seleccionados, los tubos con la fase inhibidora a las diferentes concentraciones, y se dejó la placa en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.
- j) Tras el lavado por 3 veces de cada pocillo con PBS-Tween 0,05%, se secó la placa y se procedió a la adición de 50  $\mu\text{L}$  de una anti IgE humana obtenida en cabra (Biosource cat. AHI0501) a una dilución 1:2000, en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.
- k) Tras el nuevos lavados con PBS-Tween 0,05%, se procedió a la adición de 50  $\mu\text{L}$  de una anti IgG de cabra biotinilada a una dilución 1:5.000 (Jackson ImmunoResearch; cat. 705-065-147) en solución de bloqueo durante también 1 hora a temperatura ambiente.
- l) Un lavado posterior y adición de una dilución 1:1.000 de estreptavidina-peroxidasa (Sigma cat. S5512) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.
- m) Finalmente se lavó la placa con 100  $\mu\text{L}$  y se reveló 100  $\mu\text{L}$  de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive;

Sigma T 4444, normalmente diluido 1:1 con H<sub>2</sub>O). La reacción de color azulado se mide a 650 nm, pero si se añade un volumen igual de ácido sulfúrico 2 N la reacción colorimétrica se para y el color vira a amarillo. La lectura entonces de los valores de absorbancia de la reacción ya parada (amarillo) se consigue en una longitud de onda de 450 nm, y los valores son siempre superiores a los de la reacción de la solución de TMB sin detener.

- n) Las absorbancias de cada pocillo fue obtenida tras la lectura de la placa en un lector Multiskan Acent V1.23.

La recta obtenida con los porcentajes de inhibición de las cinco concentraciones del inhibidor empleadas, se calcula según la siguiente fórmula:

$$100 - (100 \times \text{absorbancia muestra problema} / \text{absorbancia muestra BSA})$$

Una vez obtenida la recta de inhibición, se procede al cálculo de la concentración del alérgeno inhibidor, que produce un 50% de inhibición.

### 10. CUANTIFICACION DE NIVELES DE IgE ESPECÍFICA

Se realizó mediante la técnica de FEIA, empleando reactivos Pharmacia Diagnostics y empleando como fase sólida *Dermatophagoides pteronyssinus*, unidos covalentemente a discos de celulosa, activados previamente con Bromuro de Cianógeno.

#### 10.1: Activación de discos

Se siguió el método descrito por Ceska (Ceska, 1972), para lo cual los discos se obtuvieron a partir de papel Whatman n° 52 de 6 mm de diámetro. 20 g de discos fueron colocados en 200 mL de agua destilada, manteniéndose en agitación magnética suave. La solución de Bromuro de Cianógeno (20 g Sigma ref. C6388) en 600 mL de agua destilada; se añade a continuación, hasta un volumen de 800 mL y manteniéndose las condiciones de agitación magnética suave y continua durante el periodo de incubación de 30 minutos. El pH debe de ser de 10.5, para lo cual debe de añadirse continuamente una solución de hidróxido sódico 1 mM (aproximadamente se emplean 100 mL).

Finalmente los discos son lavados en un embudo Buchner de acuerdo al siguiente esquema:

- 500 mL de bicarbonato sódico 0.005 M	12 veces
- 500 mL de agua destilada	2 veces
- 500 mL de acetona 25%	2 veces
- 500 mL de acetona 50%	2 veces
- 500 mL de acetona 75%	2 veces
- 500 mL de acetona 100%	2 veces

siendo secados a temperatura ambiente y almacenándose a 4° C hasta su utilización.

### 10.2: Acoplamiento de las proteínas

Tras la preparación de una solución de extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus* en bicarbonato sódico 0.1 M conteniendo 10 mg/mL (extracto crudo) o 1 mg/mL (proteína pura), se procedió a la incubación con 0.2 mL de la misma por cada disco, durante 12 – 16 horas, en agitación suave y a una temperatura de 4° C. Una vez finalizado el periodo de incubación, cada disco fue lavado con 2.5 mL de una solución de bicarbonato sódico 0.1 M y posteriormente cada disco fue secado con una pipeta al vacío.

La incubación de cada disco con 1 mL de una solución de etanolamina 0.05 M en bicarbonato sódico 0.1 M, durante 3 horas a temperatura ambiente y con agitación suave, seguida del lavado de cada disco con 2.5 mL del siguiente esquema de soluciones de lavado:

Bicarbonato sódico 0.1 M	1 vez
Tampón acetato pH 4.5:	3 veces
- ácido acético	3 g
- acetato sódico	4.1 g
- agua destilada	1 L
Tampón de incubación:	2 veces
- cloruro sódico	9 g
- fosfato disódico dihidratado	7.2 g
- fosfato sódico monohidratado	1.3 g
- albúmina humana 20%	20%
- metiolato	0.5 g
- agua destilada hasta	1 L

Tras cada lavado de 10 minutos de duración, los discos fueron secados con una pipeta al vacío y se almacenaron congelados a -20° C hasta su utilización con una pequeña cantidad de tampón de incubación.

### 10.3: Técnica de FEIA: Determinación de IgE específica

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Wide (Wide, 1967) con modificaciones y empleando los reactivos de Pharmacia Diagnostics. Se colocan 14 discos de celulosa totalmente secos, en 14 pocillos aparte para poder realizar la curva patrón con el suero de referencia (definido en función del valor de su contenido en IgE específica). Un volumen de 50 µL de suero por disco de antígeno (muestra), es incubado durante 1 hora a temperatura ambiente, así como también 50 µL de cada uno de los sueros de referencia por duplicado (A:100 KU/L, B:50 KU/L, C:17.5 KU/L, D: 3.5 KU/L, F: 0.7 KU/L, G: 0.35 KU/L) sobre cada uno de los discos de referencia. Se tapan los pocillos y se incuba la placa durante 1 hora en agitador angular a 100 r.p.m. Tras 4

lavados seguidos con PBS-Tween 20 al 0.05% pH 7.2; los discos son secados mediante aspiración del contenido del pozo con una pipeta conectada al vacío.

Para la detección de la IgE específica unida a los discos, se utilizaron 50 µL por disco de un conjugado de β-galactosidasa anti IgE humana sobre cada uno de los discos (Pharmacia CAP system) debiendo de cuidar que los discos queden sumergidos en la solución de conjugado. Tras tapar los pozos, se incubó la placa durante 90 minutos en agitador angular a 100 r.p.m y se repiten los 4 ciclos de lavado con PBS-Tween 20 al 0.05% pH 7.2.

Se añaden 50 µL de la solución de desarrollo (development solution Pharmacia CAP System), debiendo de asegurarse que los discos quedan sumergidos adecuadamente en la solución de desarrollo. Tras tapar los pozos, se procede a una incubación de la placa durante 10 minutos en agitación angular a 100 r.p.m. Tras la adición de 300 µL de la solución stop (STOP solution de Pharmacia) compuesta por 4.2 mg de carbonato de sodio por 100 mL de agua destilada; trasladamos el contenido de los pocillos de la placa de ensayo a los pocillos vacíos de una placa de lectura (de mayor absorción de longitud de onda) para realizar dicha lectura.

La lectura se realizó en un fluorímetro (FluoroCount 96) a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades kU/L (kilo unidades/L) o Clases (1 – 5), según una curva de referencia obtenida con los estándares del fabricante Pharmacia Biotech, tal como se expresa en la tabla 8.

Suero de referencia KU / L	Clase	Nivel de IgE específica
A 50 – 100	5	Muy alto
B 17.5 – 50	4	Alto
C 3.5 – 17.5	3	Moderado
D 0.7 – 3.5	2	Bajo
E 0.35 – 0.7	1	No detectable

**Tabla 9: Unidades - Clases de IgE específica**

### 11. TOXICIDAD DE ALÉRGENOS GRUPO 1 (Der p 1) Y GRUPO 2 (Der p 2)

Los ensayos de toxicidad se diseñaron de acuerdo a lo documentado en el RD288/1991 y Farmacopea Europea 5.0.

#### 11.1: Toxicidad anormal, vía intraperitoneal en ratón de Der p 1 + Der p 2

Los ensayos fueron realizados en Vivotecnia de acuerdo a GLPs (European Directive 2004/10/CE y Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio RD 1369/2000) para evaluar la posible toxicidad de los Grupos 1 (Der p 1) y 2 (Der p 2), tras una inyección intraperitoneal (Jeringas: Plastipak

BD 300013 y aguja 25G Microlance BD 300600) en 10 ratones machos CD-1, para lo cual se randomizaron en dos grupos:

- Grupo 1: se administró una dosis de 2.5 µg (Der p 1 + Der p 2)/100 g (peso corporal) en 0.83 mL de diluyente
- Grupo 2: se administró mismo volumen de solución salina fisiológica (Braun 905-0753)

Los ratones fueron pesados y observados durante 7 días y sacrificados en el día 8° para ser necropsiados y evaluar los posibles efectos tóxicos locales y sistémicos.

### **11.2: Toxicidad anormal, vía intraperitoneal en rata de Der p 1 + Der p 2**

Los ensayos fueron realizados en Vivotecnia de acuerdo a GLPs (European Directive 2004/10/CE y Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio RD 1369/2000) para evaluar la posible toxicidad de los Grupos 1 (Der p 1) y 2 (Der p 2), tras una inyección intraperitoneal (Jeringas Plastipak BD 300013 y agujas 25G Microlance BD 300600) en 10 ratas hembras Wistar, para lo cual se randomizaron en dos grupos:

- Grupo 1: se administró una dosis de 2.5 µg (Der p 1 + Der p 2)/100 g (peso corporal) en 0.83 mL de diluyente.
- Grupo 2: se administró mismo volumen de solución salina fisiológica (Braun 905-0753).

Las ratas fueron pesadas y observadas durante 7 días y sacrificadas en el día 8° para ser necropsiadas y evaluar los posibles efectos tóxicos locales y sistémicos.

### **11.3: Evaluación de capacidad irritante no específica en ratas de Der p 1 + Der p 2 en administración por vía subcutánea.**

Los ensayos fueron realizados en Vivotecnia de acuerdo a GLPs (European Directive 2004/10/CE y Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio RD 1369/2000) para evaluar la capacidad irritante no específica, tras una inyección subcutánea (Jeringas Plastipak BD 300013 y agujas 25G Microlance BD 300600) en 10 ratas Wistar, para lo cual se randomizaron en dos grupos:

- Grupo 1: se administró una dosis de 2.5 µg (Der p 1 + Der p 2)/100 g (peso corporal) en 0.83 mL de diluyente.
- Grupo 2: se administró mismo volumen de solución salina fisiológica (Braun 905-0753).

Las ratas fueron pesadas y observadas durante 7 días y necropsiadas el día 8° para evaluación macroscópica de órganos y tejidos. Así mismo, las muestras de la piel en el área de la aplicación fueron tomadas y fijadas en una solución de formalina al 10% para su ulterior estudio histopatológico.

## **12. ESTANDARIZACION: ACTIVIDAD BIOLOGICA**

El extracto completo de *Dermatophagoides pteronyssinus* y los alérgenos purificados Der p 1 y Der p 2, así como el extracto completo desprovisto de la actividad Der p 1 y Der p 2; se valorarán biológicamente, mediante el estudio de su reactividad cutánea en pacientes sensibilizados, de acuerdo al método propuesto por Aas (Aas, 1978) y modificado por Malling (Malling, 1984 y 1987) y siempre de acuerdo con las premisas recogidas en el estudio metodológico de Dreborg (Dreborg, 1987) y que en su conjunto se encuentran publicadas en la EMEA en su Note for Guidance on Allergen Products (CPMP/BWP/243/96, 1996) que regula en la CEE éste tipo de productos. La exploración cutánea se realizó, al ensayar una serie de 3 diluciones del extracto, de razón 1:10 y que expresan la masa liofilizada del mismo, cuantificada en mg (extracto completo de *Dermatophagoides pteronyssinus* y extracto completo desprovisto de los alérgenos Der p 1 y Der p 2) o µg (alérgenos Der p 1 y Der p 2) y recompuesta con 1 mL de una solución glicerosalina al 50%.

La técnica empleada fue el Prick, realizado con lancetas de 1 mm de punta en el antebrazo de cada uno de los pacientes seleccionados y tomando como referencia, el área de la pápula que es inducida, a los 15 minutos de realizar la prueba. El valor HEP (Histamino Equivalente por Prick), se establece al comparar las pápulas obtenidas, con la inducida con una solución de clorhidrato de histamina a una concentración de 10 mg/mL; 54.3 mM/L.

Las composiciones cuali-cuantitativas de los extractos de *Dermatophagoides pteronyssinus* y de los Der p 1 y Der p 2, se establecieron mediante técnicas inmunoquímicas (ELISA Doble Sándwich), electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE) y posterior inmunodetección (Immunoblotting), utilizando sueros de los pacientes sensibilizados.

La potencia alergénica se estableció mediante la técnica de RAST Inhibición estableciéndose el valor Ag<sub>50</sub>; como la concentración de extracto o de alérgeno Der p 1 o Der p 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus* que inducía un 50% de inhibición del RAST; no existiendo en la actualidad un estándar internacional o de referencia admitido para éste tipo de extracto.

### **12.1: Pruebas cutáneas**

Se realizaron según el procedimiento descrito por Osterballe (Osterballe, 1979), en el que la punción se realiza con una lanceta de 1 mm de punta, en un ángulo de 90° con la superficie cutánea y a través de la gota de la solución de extracto diagnóstico o del control positivo de clorhidrato de histamina 10 mg/mL; 54.3 mM/L. El contorno de las pápulas obtenidas fué marcado con un rotulador de punta fina (Pilot V5) y transferido mediante una cinta adhesiva transparente a un papel milimetrado para el cálculo de las áreas por

planimetría, mediante un programa específico (AUTOCAD), que expresa las superficies en mm<sup>2</sup>.

Una vez obtenidas las áreas de cada pápula, correspondiente a cada una de las pruebas realizadas en cada paciente con las diluciones del extracto alérgico o el clorhidrato de histamina, se definió el denominado "IC" ó Índice Cutáneo (61, 62, 63) definido como "Área de pápula obtenida con el alérgeno, dividida entre el área de histamina", como medida de la sensibilidad cutánea:

$$IC = \text{Área de antígeno} / \text{Área de histamina}$$

Las pruebas se realizaron en la cara anterior del antebrazo, por duplicado y disponiéndose en línea, con una separación de 3 cm. y desde 3 cm. debajo de la zona de flexión del codo, hasta 5 cm. antes de la zona de flexión de la muñeca. En el antebrazo opuesto y por duplicado y en sentido inverso se realizaron las pruebas de las cuatro diluciones más el control positivo de histamina.

Ningún paciente recibió medicación de interferencia con la sensibilidad cutánea.

Se estableció un valor positivo de la prueba cutánea, cuando el diámetro mayor de la pápula obtenida en cada una de las pruebas se mostraba  $\geq 3$  mm.

El valor HEP, se estableció sobre la base de la realización de las medias aritméticas de las áreas de pápulas inducidas con las diferentes concentraciones de extracto ensayadas, comparadas con las medias aritméticas de las áreas obtenidas con el clorhidrato de histamina 10 mg/mL; 54.3 mM/L y estableciéndose la adecuada recta de regresión entre las áreas de pápulas y la dilución o concentración de extracto que muestra el citado área del clorhidrato de histamina.





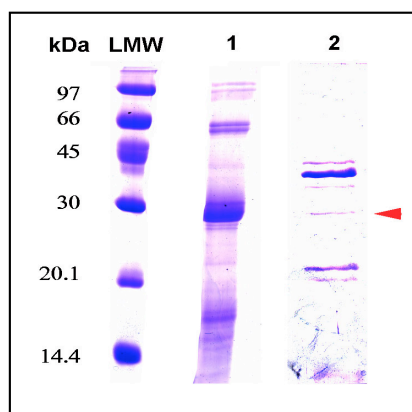
## **RESULTADOS**



## 1. PRODUCCION Y PURIFICACION DE RECOMBINANTES

### 1.1: Grupo 1 (rDer p 1)

Las especiales características de ésta proteasa han dificultado su capacidad de expresión. La propuesta de baculovirus ensayada, tanto con el “epitope-tag” de histidinas en el extremo C-terminal o sustituyendo el péptido señal por la mencionada secuencia de histidinas, que debía de conducir a disponer del alérgeno en forma de proenzima, con el “tag” de histidinas en el N-terminal de la secuencia no funcionaron adecuadamente.



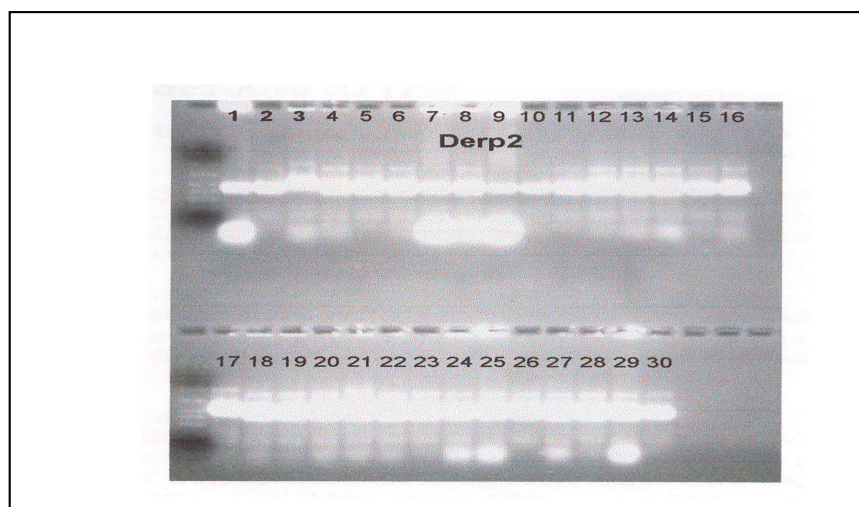
En conclusión éste tipo de metodología no parece ser la adecuada para la producción de un rDer p 1 de tamaño completo, aunque sí fragmentos del alérgeno, como puede comprobarse en el inmunoblot con sueros humanos ricos en Ig E específica *Dermatophagoides pteronyssinus*, que aparentemente carecen de la cola de histidinas, lo que dificulta su purificación en cromatografía de afinidad con las columnas de Niquel-agarosa, tal y como se muestra en la figura 13 adjunta.

**Figura 13: Inmunoblot de rDer p 1**

Resaltar finalmente que la extracción del RNA de *Dermatophagoides pteronyssinus* y su posterior ampliación por RT-PCR a partir de oligos específicos, con sitios de restricción BamHI y SpeI reveló que el cDNA tenía un tamaño de aproximadamente 900 pbs. Para su clonaje se utilizó un plásmido Fastbac de Invitrogen y transformar los ligamientos Fbac-Der p 1 a células competentes de *Escherichia coli*.

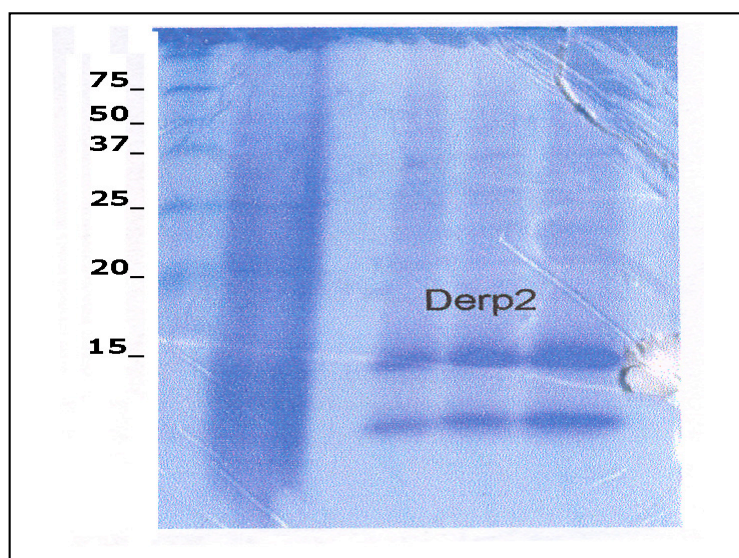
### 1.2: Grupo 2 (rDer p 2)

El mismo RNA extraído de *Dermatophagoides pteronyssinus*, amplificado por RT-PCR a partir de oligos específicos, con sitios de restricción EcoRI-SpeI, reveló que el cDNA tenía un tamaño de aproximadamente 450 pbs cuando se reveló en el gel de agarosa. Para el clonaje en el plásmido pFastbac1, se dirigió dicho plásmido con los mismos enzimas de restricción anteriormente utilizados, para a continuación ligar el plasmado con el DNA obtenido y transformar los ligamientos Fbac-Der p 2 en células competentes de *Escherichia coli*. El colony-PCR con los oligos flanqueantes de pFastbac1 de las colonias supuestamente transformantes mostró una identidad del 99.3% de las secuencias del DNA (secuencia banco de datos Der p 2: AX398783) y de la proteína del plásmido Fbac-Der p 2. Tras transfectar las células de insecto con DNA del bácmido recombinante (colonias de células DH10Bac transformadas) y colección del virus stock, se determinó la expresión proteica de dichas células.



**Figura 14. “Colony-PCR” de colonias aisladas del clonaje Fbac1-Der p 2**

Mediante SDS-PAGE se observa el grado de pureza de la proteína purificada y la validez del virus recombinante utilizado.



**Figura 15: SDS-PAGE rDer p 2**

Las proteínas de fusión se purificaron prácticamente a homogeneidad (>90% de pureza) a partir de extractos celulares, de células crecidas en monocapa, mediante cromatografía de afinidad con columnas de Cobalto-Agarosa, y posteriormente las proteínas se eluyeron en tampón EDTA 50 mM.

Mediante SDS PAGE se obtuvieron datos de la presencia y el grado de pureza de las proteínas purificadas como revelan las imágenes de las figuras 14 y 15, confirmando de esta forma la presencia de las proteínas y la validez del virus recombinante utilizado.

## **2. INMUNIZACION: PRODUCCION DE ANTISUEROS**

Con el objetivo de disponer de anticuerpos policlonales monoespecíficos de los alérgenos de Grupos 1 (Der p 1) y 2 (Der p 2), se inmunizaron conejos utilizando los alérgenos recombinantes (rDer p 2) producidos anteriormente o bien péptidos diseñados específicamente del alérgeno (Der p 1), en adyuvante completo de Freund, alternativamente por vía subcutánea e intramuscular cada 15 días. La última recolección de sangre se efectuó aproximadamente a los 80 días de la primera inmunización.

### **2.1 Inmunización con péptidos de Der p 1**

El antisuero que mejor funcionó fue el obtenido contra dos péptidos sintéticos y que fué denominado como 1037.

Estos péptidos de 16 aminoácidos se diseñaron en base a sus perfiles hidrofílicos y de muy probable ubicación en la superficie de la región activa del alérgeno Der p 1 (98 a 320 de la secuencia P08176 de la base de datos) y que no parecen presentar ninguna modificación postransduccional, ni intervenir en la formación de puentes disulfuro en la forma nativa.

aa 250-265: NH<sub>2</sub> – **HYDGRTIIQRDNGYPQ** – CONH<sub>2</sub>

aa 283-298: NH<sub>2</sub> – **YWIVRNSWDTNWGDNG** – CONH<sub>2</sub>

### **2.2 Inmunización con rDer p 2**

El antisuero generado por el alérgeno recombinante rDer p 2, expresado en baculovirus, se mostró muy eficaz en su capacidad de retener ulteriormente mediante cromatografía de afinidad el alérgeno en forma nativa Der p 2.

Este recombinante fue trasladado en su forma de expresión a bacteria para independizar el sistema de baculovirus.

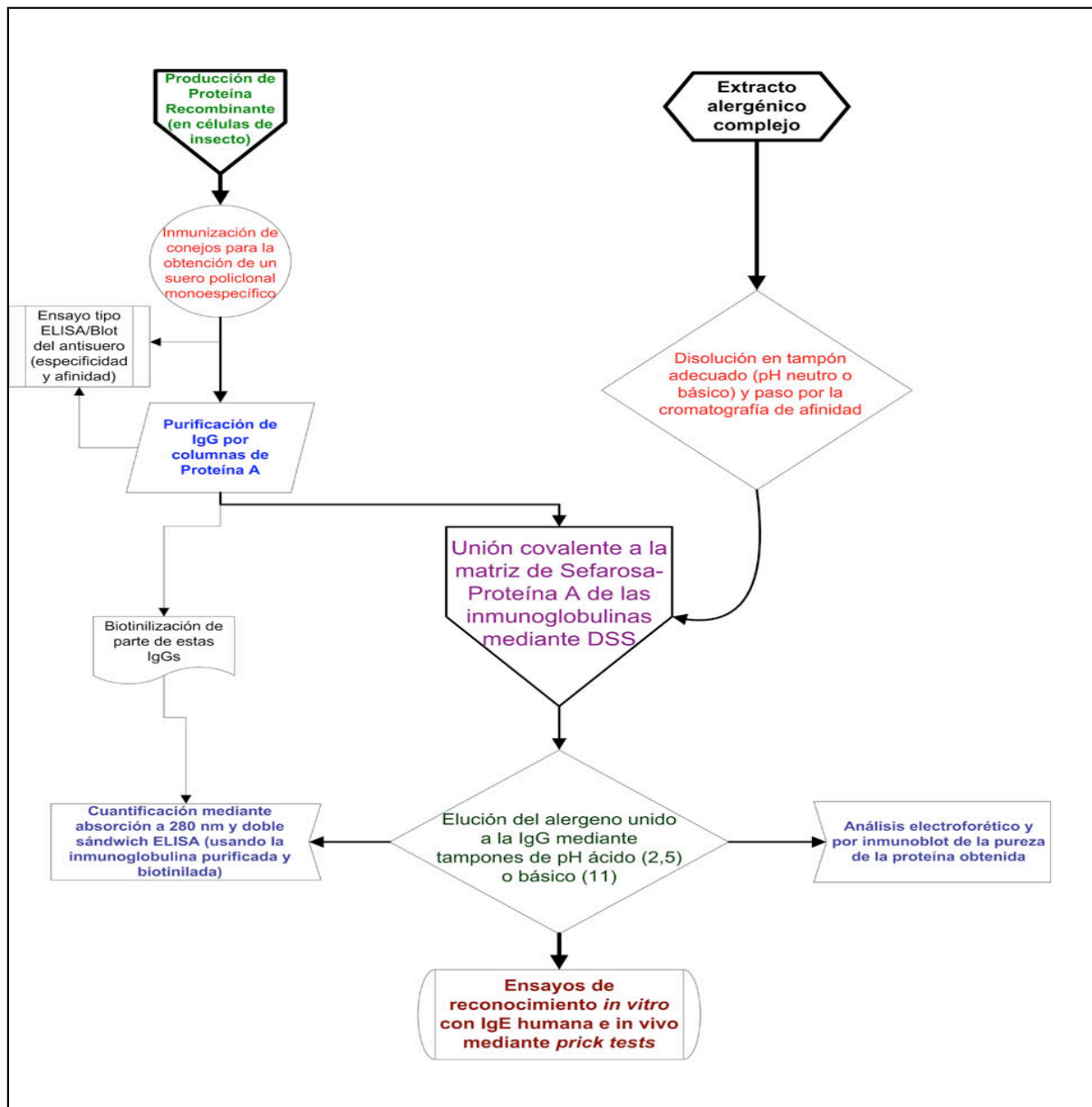
## **3. PURIFICACION MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD**

Los antisueros seleccionados se emplearon para preparar columnas de afinidad, tanto de Agarosa/Sefarosa activada con bromuro de cianógeno en las que se han unido las inmunoglobulinas (Hermanson et al. 1992; Towbin et al. 1979) o Sefarosa-proteína A, en la que la inmunoglobulina queda unida covalentemente y orientada con los Fab hacia el exterior (Venturi et al. 2000), gracias al DSS, disuccinimidil suberato, compuesto insoluble en agua (non-cleavable), que inmoviliza moléculas a través de las aminas primarias formando un enlace amino covalente. En proteínas sólo las ε-aminas de la lisina reaccionan significativamente con los ésteres –NHS.

Así mismo, con estos anticuerpos y mediante la aplicación de la técnica de doble sándwich ELISA (Fahlbusch et al. 1994), se puede cuantificar el contenido de alérgeno. El método consistió en la unión de uno o varios anticuerpos para la captura del alérgeno, con el fin de evitar los posibles

cambios conformacionales que pudieran originarse con la unión directa de la proteína a la fase sólida. Tras marcar con biotina los residuos glucídicos (EZ-Link Biotin-Hydrazide, Pierce) de las inmunoglobulinas empleadas en la parte superior del sándwich, lo que preserva mantener su total actividad inmunológica, el proceso se complementó con un paso adicional de estreptavidina-peroxidasa y revelado colorimétrico con substratos propios del enzima como el TMB o ABTS con agua oxigenada.

La siguiente figura muestra un esquema del proceso seguido en la purificación de los alérgenos.



**Figura 16. Esquema de purificación de alérgenos mayores**

3.1) Der p 1

El anticuerpo que mejor ha funcionado en la purificación por cromatografía de afinidad de Der p 1 es uno de los obtenidos contra péptidos sintéticos denominado “1037”. Los mejores resultados en cromatografía de afinidad se obtienen con el extracto en PBS con junto con cierta proporción de detergentes: SDS y NP-40. En este caso el alérgeno se libera a pH básicos (trietanolamina 50 mM a pH 11,5).

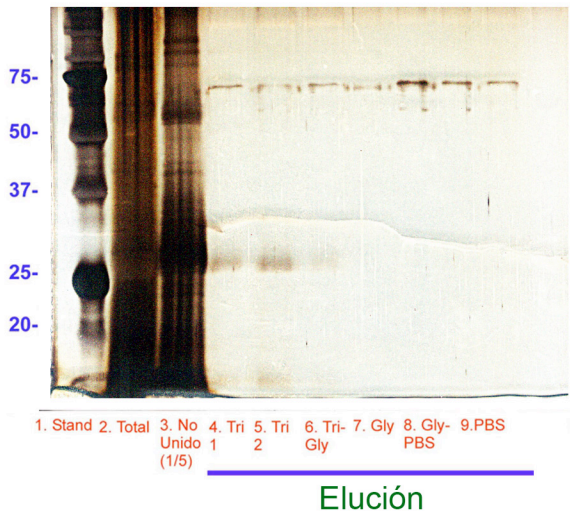


Figura 17: Resultados de cromatografía de afinidad: liberación de Der p 1

El alérgeno obtenido es de gran pureza como se muestra en la figura anterior y el rendimiento se cifra en 100 µg por pasada/elución de la columna. Las columnas parecen perder capacidad de retención, debida posiblemente a la propia naturaleza tiol – proteasa del alérgeno Der p 1 que puede inducir una degradación del anticuerpo unido a la proteína A, obtenido a partir del inmunosuero generado contra el péptido 1037.

3.2) Der p 2

La columna de anti-Der p 2 retiene el alérgeno a partir de extracto en condiciones nativas, aunque la presencia de detergentes (SDS y NP-40) parece facilitar la unión. El alérgeno se libera a pH ácidos (glicina 50 mM a pH 2,5). Las muestras se analizan posteriormente mediante electroforesis/blot, son dializadas y liofilizadas con manitol a concentraciones de ≤1 mg/mL.

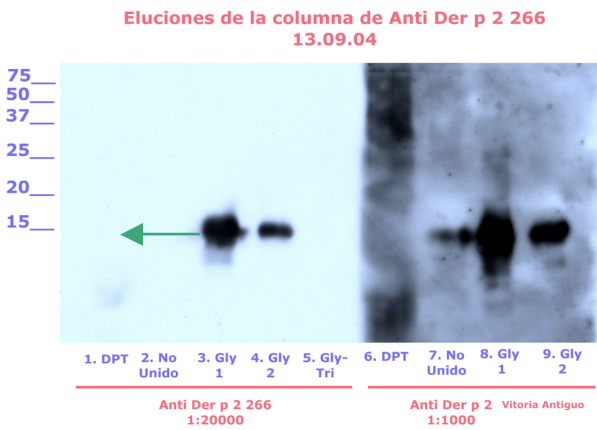


Figura 18: Resultados de cromatografía de afinidad: liberación de Der p 2



La eficacia de la columna, como muestra la figura elimina el 100% del Der p 2 del extracto completo, con un rendimiento 200 µg por pasada/elución.

### 4. TOXICIDADES

#### 4.1) Toxicidad anormal por vía intraperitoneal en ratón

El estudio de toxicidad anormal por vía intraperitoneal en ratón CD-1 de los alérgenos Der p 1 + Der p 2 (Lote 01/05), ensayados a una concentración de 2.5 µg/100 g de peso corporal, fueron satisfactorios y considerados como no tóxicos (Informe interno Diater: Vivotecnia B-00108).

#### 4.2) Toxicidad anormal por vía intraperitoneal en rata

El estudio de toxicidad anormal por vía intraperitoneal en rata Wistar de los alérgenos Der p 1 + Der p 2 (Lote 01/05), ensayados a una concentración de 2.5 µg/100 g de peso corporal, fueron satisfactorios y considerados como no tóxicos (Informe interno Diater: Vivotecnia MG/0080/05).

#### 4.3) Evaluación de la capacidad irritante no específica en rata vía subcutánea

El estudio de tolerancia local o capacidad irritante no específica en rata Wistar de los alérgenos Der p 1 + Der p 2 (Lote 01/05), ensayados a una concentración de 2.5 µg/100 g de peso corporal fueron satisfactorios y categorizados como de no irritantes (Informe interno Diater: Vivotecnia MG/0081/05).

### 5. ACTIVIDAD ALERGENICA: PRUEBAS CUTANEAS Y ESTANDARIZACION

Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en los 40 pacientes seleccionados a partir de su presunta sensibilidad a ácaros domésticos, realizadas mediante pruebas cutáneas por Prick test y valoradas planimétricamente en términos de mm<sup>2</sup> de áreas de pápulas obtenidas con los diferentes alérgenos y concentraciones .

Conforme a lo indicado e el apartado de materiales y métodos se establecieron las siguientes características de los extractos ensayados:

- a) Extracto alérgénico completo del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, estandarizado biológicamente a un valor de 5 HEP \*.
- b) Alergeno Der p 1 ajustado en términos de masa a 50, 5 y 0.5 µg.
- c) Alergeno Der p 2 ajustado en términos de masa a 10, 1 y 0.1 µg.
- d) Alérgenos Der p 1+Der p 2 ajustados en términos de masa a 60, 6 y 0.6 µg.
- e) Extracto alérgénico completo del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, en el que se ha eliminado la actividad de los alérgenos Der p 1 y Der p 2.



\* El valor HEP define la masa alergénica del extracto, que induce una actividad biológica, en términos de área de pápula, del mismo tamaño que la obtenida con una prueba control de histamina 10 mg/mL, cuando se realiza mediante la técnica del Prick test.

Paciente	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> 5 HEP	Histamina 10 mg
1	92.03 mm <sup>2</sup>	23.19 mm <sup>2</sup>
2	40.69 mm <sup>2</sup>	17.69 mm <sup>2</sup>
3	30.28 mm <sup>2</sup>	25.17 mm <sup>2</sup>
4	29.44 mm <sup>2</sup>	28.68 mm <sup>2</sup>
5	23.40 mm <sup>2</sup>	18.97 mm <sup>2</sup>
6	28.15 mm <sup>2</sup>	21.08 mm <sup>2</sup>
7	17.70 mm <sup>2</sup>	25.98 mm <sup>2</sup>
8		24.72 mm <sup>2</sup>
9	141.76 mm <sup>2</sup>	16.89 mm <sup>2</sup>
10		29.46 mm <sup>2</sup>
11	84.85 mm <sup>2</sup>	28.05 mm <sup>2</sup>
12	55.84 mm <sup>2</sup>	32.25 mm <sup>2</sup>
13	27.74 mm <sup>2</sup>	31.83 mm <sup>2</sup>
14	172.05 mm <sup>2</sup>	37.80 mm <sup>2</sup>
15	26.97 mm <sup>2</sup>	37.47 mm <sup>2</sup>
16	100.77 mm <sup>2</sup>	21.05 mm <sup>2</sup>
17	15.77 mm <sup>2</sup>	30.98 mm <sup>2</sup>
18	98.77 mm <sup>2</sup>	37.82 mm <sup>2</sup>
19	18.74 mm <sup>2</sup>	15.21 mm <sup>2</sup>
20	54.26 mm <sup>2</sup>	27.66 mm <sup>2</sup>
21	45.06 mm <sup>2</sup>	33.64 mm <sup>2</sup>
22	50.91 mm <sup>2</sup>	25.61 mm <sup>2</sup>
23	59.90 mm <sup>2</sup>	53.06 mm <sup>2</sup>
24	26.25 mm <sup>2</sup>	26.88 mm <sup>2</sup>
25	119.89 mm <sup>2</sup>	85.41 mm <sup>2</sup>
26	123.46 mm <sup>2</sup>	73.68 mm <sup>2</sup>
27	75.97 mm <sup>2</sup>	37.46 mm <sup>2</sup>
28	17.34 mm <sup>2</sup>	33.37 mm <sup>2</sup>
29	94.38 mm <sup>2</sup>	53.55 mm <sup>2</sup>
30	65.71 mm <sup>2</sup>	44.28 mm <sup>2</sup>
31	94.38 mm <sup>2</sup>	31.45 mm <sup>2</sup>
32	64.87 mm <sup>2</sup>	29.98 mm <sup>2</sup>
33	80.43 mm <sup>2</sup>	51.77 mm <sup>2</sup>
34	202.93 mm <sup>2</sup>	52.21 mm <sup>2</sup>
35		50.29 mm <sup>2</sup>
36	102.52 mm <sup>2</sup>	49.36 mm <sup>2</sup>
37	31.30 mm <sup>2</sup>	43.14 mm <sup>2</sup>
38	24.18 mm <sup>2</sup>	38.17 mm <sup>2</sup>
39	21.19 mm <sup>2</sup>	27.12 mm <sup>2</sup>
40	67.11 mm <sup>2</sup>	38.52 mm <sup>2</sup>
<b>Medias</b>	<b>65.59 mm<sup>2</sup></b>	<b>35.31 mm<sup>2</sup></b>
<b>IC</b>	<b>1.86</b>	

**Tabla 10: Áreas de pápulas obtenidas con el extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* e histamina clorhidrato**

Tan sólo 3 (8, 10 y 35) de los 40 pacientes seleccionados no presentaron positividad a las pruebas cutáneas, por lo que se eliminaron de los cálculos del estudio.

Paciente	Der p 1 50 µg	Der p 1 5 µg	Der p 1 0.5 µg	Der p 2 10 µg	Der p 2 1 µg	Der p 2 0.1 µg
1	37.97	25.41		17.31	13.88	
2	58.73	6.17				
3	24.63	5.92		12.63	4.32	
4	23.57	11.02	2.58	17.12	3.12	
5	7.88			59.61		
6						
7						
8						
9	150.97	82.80		36.29		
10						
11	33.05	18.14	9.65	81.19	5.48	
12	25.78			28.07		
13						
14	44.81	16.06		47.67		
15	18.60	8.44		10.90		
16	108.25	27.40		33.41		
17				10.69		
18	53.97	10.70		27.94	3.70	
19						
20	93.92	72.27	36.49	57.28		
21	16.98	10.11		39.50	7.03	
22	91.39			74.51		
23	19.44			27.06		
24	13.98			28.14		
25	77.91	42.01	14.02			
26	235.70	34.66	14.99	103.43		
27				38.44	19.13	
28	16.64	5.80				
29	19.12	11.42		43.62		
30	53.77	46.58	13.92			
31				28.54		
32	7.27					
33	98.28	22.39		17.83		
34	32.73	27		49.10		
35						
36	121.51					
37	26.95			32.20		35.50
38	27.05			78.09		
39						
40	74.06	18.11		33.72		
<b>Medias</b>	<b>55.65</b>	<b>25.12</b>	<b>15.27</b>	<b>39.78</b>	<b>8.09</b>	<b>NC</b>
<b>IC</b>	<b>1.57</b>	<b>0.71</b>	<b>0.43</b>	<b>1.12</b>	<b>0.23</b>	<b>NC</b>

**Tabla 11: Áreas de pápulas obtenidas con los alérgenos Der p 1 y Der p 2**

29 de los 37 pacientes admitidos con pruebas cutáneas positivas al extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* lo fueron también a Der p 1 (50 µg). En el caso del Der p 2 (10 µg) la concordancia obtenida fué de 26.

Paciente	<i>D pteronyssinus</i> 5 HEP*	Der p 1+2 60 µg	Der p 1+2 6 µg	Der p 1+2 0.6 µg	<i>D pteronyssinus</i> – Der p 1+2
1	92.03	45.11	15.01		35.72
2	40.69	12.79	4.20		23.38
3	30.28	17.13	11.02		10.75
4	29.44	33.35	16.79	5.86	38.45
5	23.40	12.74	5		30.04
6	28.15				14.57
7	17.70				19.42
8					
9	141.76	65.95	23.24		65.74
10					
11	84.85	127.69	36.39	11.13	54.67
12	54.84	33.69	20.63	8.18	44.92
13	27.74				46.99
14	172.05	60.96	24.80		52.78
15	26.97	23.19	11		13.55
16	100.77	72.43	50.61		57.48
17	15.77	11.63			7.01
18	98.77	72.54	14.34	4.55	24.35
19	18.74				
20	54.26	70.63	39.13	11.09	35.50
21	45.06	30.47	18.72		16.74
22	50.91	62.37	23.06		46.14
23	59.90	31.56			26.70
24	26.25	33.24	8.70		29.40
25	119.89	162.94	42.89	14.29	122.40
26	123.46	44.01	36.33		57.31
27	75.97	70.83	40.19		104.79
28	17.34	12.60			
29	94.38	33.43	7.82		85.91
30	65.71	81.26	52.95	5.41	103.08
31	94.38	42.52			154.51
32	64.87	22.75			31.86
33	80.43	52.65	23.01		59.05
34	202.93	44.51	35.79		124.66
35					
36	102.52	83.80	18.17		107.30
37	31.30	29.66			21.77
38	24.18	23.64	27.07		26.94
39	21.19			33.42	17.83
40	67.11	27.70	20.93		39.01
<b>Medias</b>	<b>35.31</b>	<b>48.43</b>	<b>24.14</b>	<b>8.64</b>	<b>50.02</b>
<b>IC</b>		<b>1.37</b>	<b>0.68</b>	<b>0.24</b>	<b>1.41</b>

\*Valor 5 HEP correspondiente a IHR con contenidos Der p 1: 20 µg/mL

Der p 2: 5 µg/mL

**Tabla 12: Áreas de pápulas obtenidas con el extracto completo de *Dermatophagoides pteronyssinus*, los alérgenos Der p 1 + Der p 2 y el extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* desprovisto de los alérgenos Der p 1 y Der p 2**

Los valores de referencia para 1 HEP de los alérgenos mayores se definieron en relación con el área de la histamina clorhidrato 10 mg/mL, tal y como se expresan en la siguiente tabla:

Alergeno mayor	Valor HEP	µg/mL
<i>D. pteronyssinus</i> (Der p 1+Der p 2)	1 HEP	5.00
Der p 1	1 HEP	23.34
Der p 2	1 HEP	8.72
Der p 1 + Der p 2	1 HEP	35.29

**Tabla 13: Valores HEP de los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2**

### 6. SUEROS: Determinación de Ig E específica

La siguiente tabla muestra los valores de Ig E específica:

Paciente	IgE (kU/L) <i>D. pteronyssinus</i>	IgE (kU/L) <i>D. farinae</i>
1	20.7	11.50
2	>100	72
3	7.98	5.22
4	14.8	10.8
5	1.96	1.04
6	4.97	2.29
7	5.19	3.36
8	3	3
9	37.7	21.5
10	-----	-----
11	49.3	25.6
12	9.18	6.25
13	2.83	1.39
14	21.3	17.9
15	7.86	3.29
16	10.6	6.05
17	7.27	5.68
18	4.09	3.37
19	24.2	17.4
20	16.7	7.51
21	29.8	24
22	6.15	3.39
23	13.3	14
24	-----	-----
25	33.8	25.6
27	38	11
29	5.1	3.99
30	4.69	1.71
31	9.53	3.58
32	20.9	6.98
33	10.1	10.3
34	8.65	4.32
35	22.1	6.96
36	> 100	> 100
37	5.01	6.06
38	-----	-----
39	4.91	2.4
40	25.4	32.5
<b>Medias</b>	12.6	11.4

**Tabla 14: Valores de Ig E específica frente a las dos especies de ácaros más representativas: *D. pteronyssinus* & *D. farinae***

La concordancia observada entre los valores obtenidos a partir del suero de los 40 pacientes en la Ig E alérgeno específica, frente a ambas especies de ácaros es del 100 %. Si trasladamos los valores de kU/L a clases, en 32 de los 40 pacientes sensibilizados a *D. pteronyssinus* la media se estableció en el intervalo de la clase 3 (niveles moderados de Ig E específica: 3.5 – 17.5 kU/L) y en el caso del *D. farinae* 24 de los 40 pacientes se incorporaron en el mismo intervalo.

7. INMUNOBLOT

El inmunoblotting realizado y que se muestra en la figura siguiente perfila la capacidad de fijación de IgE por los distintos alérgenos presentes en el extracto del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, que se ha recortado y ampliado en el entorno de los pesos moleculares de los alérgenos Der p 1 y Der p 2

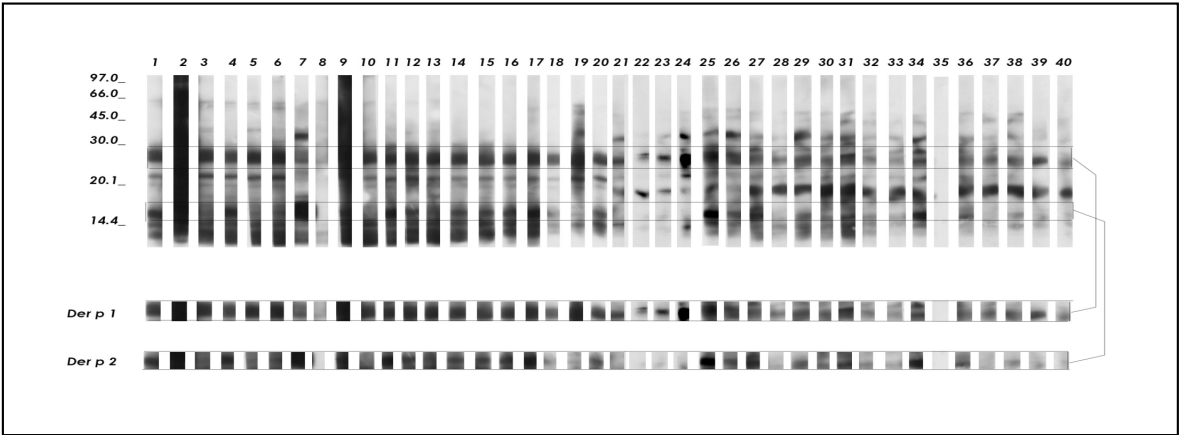


Figura 19: Resultado del inmunoblotting realizado en muestras de suero

Resaltar de los resultados obtenidos las concordancias entre las negatividades en pruebas cutáneas, título sérico de Ig E específica y fijación de Ig E en inmunoblot en los sueros de los pacientes 8 y 35.

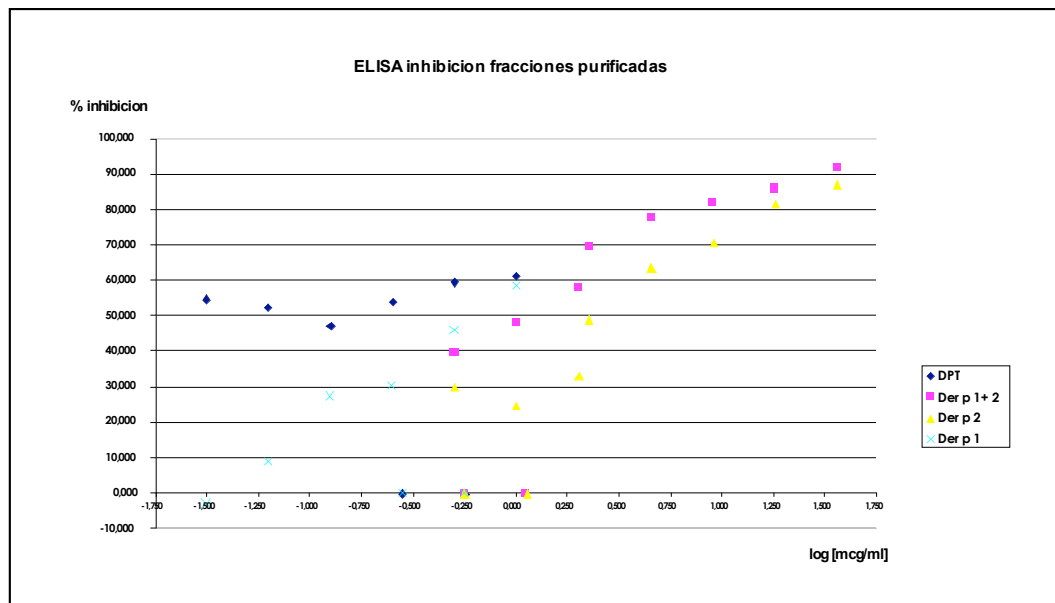
8. ELISA inhibición: Potencia alérgica. Valores Ag<sub>50</sub>

Los valores Ag<sub>50</sub> expresados en µg para el extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* y los alérgenos Der p 1, Der p 2 y Der p 1 + Der p 2, se especifican en la tabla siguiente:

Descripción	Valor Ag <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (extracto)	0.075
Der p 1	0.610
Der p 2	3.221
Der p 1 + Der p 2	0.873

Tabla 15: Valores Ag<sub>50</sub> de extractos y alérgenos mayores

La siguiente figura muestra los resultados de los valores  $Ag_{50}$ :



**Figura 20: Representación gráfica de los valores  $Ag_{50}$  obtenidos**

Las  $Ag_{50}$  fueron obtenidas por regresión lineal al extrapolar el 50 % de inhibición sobre la concentración que origina dicha inhibición.

## 9. Valores estadísticos

### 9.1) Sensibilidad de actividad biológica de los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2, frente al extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus*

El ensayo de sensibilidad se realizó comparando de forma homogénea los resultados obtenidos con los distintos alérgenos Der p 1, Der p 2 y los de Der p 1 + Der p 2; así como con el extracto completo de *Dermatophagoides pteronyssinus* desprovisto de la actividad de Der p 1 + Der p 2; considerando como “estándar de oro” o referencia, el extracto completo de *Dermatophagoides pteronyssinus* en prueba cutánea mediante Prick test. Los resultados se muestran a continuación:

	<i>D. pteronyssinus</i> (extracto)	Positivo	Negativo	Total
Prick Der p 1	Positivo	29	1	30
	Negativo	8	2	10
	Total	37	3	40
	Sensibilidad	0.7838	78.38	
	Especificidad	0.6667	66.67	
	Valor Predictivo Positivo	0.9667	96.67	
	Valor Predictivo Negativo	0.0750	7.50	
Prick Der p 2	Positivo	26	0	26
	Negativo	11	3	14
	Total	37	3	40
	Sensibilidad	0.7027	70.27	
	Especificidad	1.0000	100	
	Valor Predictivo Positivo	1.0000	100	
	Valor Predictivo Negativo	0.0750	7.50	
Prick Der p (1 + 2)	Positivo	32	0	32
	Negativo	5	3	8
	Total	37	3	40
	Sensibilidad	0.8649	86.49	
	Especificidad	1.0000	100	
	Valor Predictivo Positivo	1.0000	100	
	Valor Predictivo Negativo	0.0750	7.50	
Prick <i>D. pteronyssinus</i> desprovisto de Der p (1 + 2)	Positivo	35	0	35
	Negativo	2	3	5
	Total	37	3	40
	Sensibilidad	0.9459	94.59	
	Especificidad	1.0000	100	
	Valor Predictivo Positivo	1.0000	100	
	Valor Predictivo Negativo	0.0750	7.50	

**Tabla 16: Valores de actividad biológica de los alérgenos Der p 1 y Der p 2**

## 9.2) Sensibilidad de actividad biológica de los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2 frente a fijación de Ig E específica

El ensayo estadístico de sensibilidad entre los alérgenos mayores y la fijación de Ig E específica en suero frente a *Dermatophagoides pteronyssinus*, se realizó de forma análoga a la detallada en el punto anterior, considerando un punto de corte en los resultados de Ig E específica  $\geq 3.5$  kU/L, de acuerdo a una clase igual o superior a 3 en CAP y cuyos resultados se muestran en la siguiente tabla:

	IgE <i>D. pteronyssinus</i> : $\geq 3.5$	Positivo	Negativo	Total
Prick Der p 1	Positivo	26	1	27
	Negativo	7	2	9
	Total	33	3	36
	Sensibilidad	0.7879	78.79	
	Especificidad	0.6667	66.67	
	Valor Predictivo Positivo	0.9630	96.30	
	Valor Predictivo Negativo	0.0833	8.33	
Prick Der p 2	Positivo	24	1	25
	Negativo	9	2	11
	Total	33	3	36
	Sensibilidad	0.7273	72.73	
	Especificidad	0.6667	66.67	
	Valor Predictivo Positivo	0.9600	96.00	
	Valor Predictivo Negativo	0.0833	8.33	
Prick Der p (1 + 2)	Positivo	30	1	31
	Negativo	3	2	5
	Total	33	3	36
	Sensibilidad	0.9091	90.91	
	Especificidad	0.6667	66.67	
	Valor Predictivo Positivo	0.9677	96.77	
	Valor Predictivo Negativo	0.0833	8.33	
Prick <i>D. pteronyssinus</i> desprovisto de Der p (1 + 2)	Positivo	30	2	32
	Negativo	3	1	4
	Total	33	3	36
	Sensibilidad	0.9091	90.91	
	Especificidad	0.3333	33.33	
	Valor Predictivo Positivo	0.9375	93.75	
	Valor Predictivo Negativo	0.0833	8.33	
Prick <i>D. pteronyssinus</i> (extracto)	Positivo	32	2	34
	Negativo	1	1	2
	Total	33	3	36
	Sensibilidad	0.9697	96.97	
	Especificidad	0.3333	33.33	
	Valor Predictivo Positivo	0.9412	94.12	
	Valor Predictivo Negativo	0.0833	8.33	

**Tabla 17: Valores de actividad biológica y fijación de Ig E específica**



## **DISCUSION**



**V. DISCUSION**

La utilización de los alérgenos en la investigación de los procesos alérgicos, así como en el diagnóstico etiológico y el tratamiento de las enfermedades alérgicas constituye una herramienta imprescindible (Bousquet, 1998).

En los extractos alérgenos, sólo una pequeña parte de las proteínas extraídas muestran una actividad alérgica, lo cual, si bien a nivel de diagnóstico no tiene una especial relevancia, fuera de las inherentes a la exacta tipificación de la fuente alérgica y por ejemplo al fenómeno de la reactividad cruzada; y sin embargo si podría tener una cierta trascendencia en el apartado de su utilización en la inmunoterapia, por cuanto podríamos estar administrando moléculas alérgicas o no alérgicas de efectos desconocidos y por tanto de implicaciones inmunológicas o farmacológicas no adecuadamente definidas.

El objetivo de la estandarización de los alérgenos es preparar composiciones conocidas de forma reproducible para su uso diagnóstico y terapéutico y es fácilmente entendible que ésta puede conseguirse de una forma más precisa con uno o pocos alérgenos perfectamente caracterizados (van Ree, 1998).

En el apartado de producción de alérgenos recombinantes de las formas rDer p 1 y rDer p 2 en células de insectos -baculovirus- y posterior reconocimiento del alérgeno expresado los resultados obtenidos indican que el sistema de expresión no parece ser el adecuado para el rDer p 1 y sin embargo si para el rDer p 2.

En el caso concreto de rDer p 1 y aún cuando las proteínas de fusión analizadas en SDS PAGE e inmunoblotting son reconocidas, su capacidad inmunizante a la hora de la producción de antisueros es menor, que cuando se utilizaron los péptidos señal sintéticos de 16 aminoácidos indicados anteriormente y que se diseñaron en función de incluir un posible epitopo conformacional. Con ninguno de los dos péptidos señal, pudo demostrarse la fijación de Ig E específica.

En el caso del rDer p 2, tanto la proteína de fusión obtenida, como su característica inmunizante del antisuero de elevado título generado, tuvieron un buen comportamiento, tanto en la fijación de Ig E específica, como en el grado de pureza y rendimiento del proceso de obtención del Der p 2, lo que confirmó la validez del método de utilización del virus recombinante empleado.

La utilización de anticuerpos policlonales monoespecíficos se realizó en base a la disyuntiva de la mejor capacidad de reconocimiento de variantes alérgicas que muestran estos sobre los anticuerpos monoclonales, que al

reconocer un solo epitopo limita su capacidad de selección del alérgeno (Aalberse y van Ree. 2000).

Los alérgenos Der p 1 y Der p 2, reaccionan con la mayoría de los pacientes sensibilizados a *Dermatophagoides pteronyssinus* como lo muestran los resultados de las pruebas cutáneas y del inmunoblotting, así como de los ensayos de inhibición de Ig E. Aún cuando un único alérgeno no debe de cubrir todo el espectro alérgénico de una fuente alérgénica, en determinadas circunstancias donde la prevalencia de los alérgenos aislados sea significativa, la justificación de uso del mismo entendemos estaría más que justificada. En nuestro caso los resultados que obtenemos en las pruebas cutáneas con los alérgenos Der p 1 (Grupo 1) y Der p 2 (Grupo 2) son superponibles con los resultados experimentales de otros autores (Yasueda, 1993) que muestran un coeficiente de correlación  $r = 0.954$  ( $n = 79$ ) para el Grupo 1 y de  $r = 0.984$  ( $n = 82$ ) para el Grupo 2 con respecto a *Dermatophagoides farinae*.

Un aspecto que debemos de considerar son los resultados de la reactividad de los sueros en inmunoblotting y su título de Ig E específica. Si bien existe una reactividad de la Ig E específica frente a *Dermatophagoides pteronyssinus* con organismos invertebrados, la prevalencia de la sensibilización de estos últimos sólo puede ser demostrada mediante la utilización de alérgenos purificados, como Der p 1 (Grupo 1) y Der p 2 (Grupo 2), que eviten o minimizen el fenómeno de reactividad cruzada atribuible en estos casos al Grupo 10 ó Der p 10 o tropomiosina (Aalberse, 1998).

La estandarización de los extractos alérgénicos se basa en la cuantificación de los alérgenos mayores (van Ree, 2000) y en la definición de su actividad biológica sobre una muestra de pacientes sensibilizados y comparadas con la obtenida con la histamina a una concentración de 10 mg/mL, mediante el análisis de las áreas de las pápulas obtenidas. Los valores de la citada estandarización muestran que las medias de los valores HEP son concordantes con los esperados. Análogamente los resultados de Ag<sub>50</sub> muestran similar concordancia tal y como se muestra en la siguiente tabla resumen:

Valores de 1 HEP	Der p 1+Der p 2	Histamina 10 mg/m	Ag <sub>50</sub> µg/mL
<i>D. pteronyssinus</i>	(4+1): 5.00 µg/mL	35.31 mm <sup>2</sup> pápula	0.075
Der p 1	23.34 µg/mL	35.31 mm <sup>2</sup> pápula	0.610
Der p 2	8.72 µg/mL	35.31 mm <sup>2</sup> pápula	3.221
Der p 1 + Der p 2	35.29 µg/mL	35.31 mm <sup>2</sup> pápula	0.873

**Tabla 18: Resultados de la valoración de la actividad biológica y potencia alérgénica del extracto alérgénico de *Dermatophagoides pteronyssinus* y los alérgenos mayores Der p 1 (Grupo 1) y Der p 2 (Grupo 2).**

En la actualidad se estima la necesidad de la valoración de 1 a 3 alérgenos, de los denominados mayores, para una correcta estandarización (van Ree, 2000) y los resultados que se muestran en la anterior tabla son adecuados para la correcta estandarización. Efectivamente, como anteriormente postulábamos, los resultados concuerdan con lo esperado, pues a nivel de reactividad cutánea el alérgeno Der p 1 cuando se utiliza aisladamente necesita del entorno de 5 veces su valor presente en el extracto mezcla de *Dermatophagoides pteronyssinus* para igualarse al mismo, en términos de actividad biológica y de más de 8 veces su valor para Der p 2. En la consideración de Der p 1 + Der p 2, el valor que iguala la actividad biológica se estima 7 veces superior al presente en el extracto mezcla.

En el apartado de potencia alérgica, los valores de las  $Ag_{50}$ , siguen la misma progresión, necesitándose de concentraciones más elevadas para conseguir el 50% de la inhibición, concretamente 0.610  $\mu\text{g/mL}$  para Der p 1, 3.221  $\mu\text{g/mL}$  para Der p 2 y 0.873 para Der p 1 + Der p 2; datos todos ellos en referencia al valor de 0.075  $\mu\text{g/mL}$  obtenido para el extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Es necesario considerar que el extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*, contiene al menos 19 alérgenos descritos con capacidad fijadora de Ig E y que su masa alérgica, en términos de 1 HEP se estimó en un valor de 13.118 mg/mL, aún cuando en las pruebas cutáneas se empleó a 5 HEP (Dreborg, 1987) para la selección de los pacientes del estudio. Este hecho ratifica la importante relevancia de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, no sólo en cuanto a su especificidad en los resultados de las pruebas cutáneas, sino también en cuanto a su capacidad fijadora de Ig E y puede explicar las diferencias de la citada reactividad en alguno de los pacientes admitidos al estudio, por la presunta implicación de otros alérgenos relevantes, así como de algunas casuísticas no consideradas, como otras presuntas sensibilidades de pacientes del estudio, tal sería el caso de los pacientes sensibilizados a ácaros con alergia a la almeja, en las que sus sueros muestran una fuerte inhibición (Wittelman, 1995).



## **CONCLUSIONES**





1. Se clonaron, expresaron y purificaron los alérgenos recombinantes rDer p 1 y rDer p 2, correspondientes a los denominados Grupos 1 y 2 respectivamente de la especie de ácaro doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus*, mediante tecnología de expresión en células de insectos mediada con baculovirus.
2. Ambos alérgenos recombinantes fueron reconocidos por un “pool” de sueros de pacientes sensibilizados al citado ácaro doméstico.
3. Se produjeron antisueros policlonales monoespecíficos en conejo frente al alérgeno recombinante rDer p 2 de elevado título; no así frente al alérgeno rDer p 1, por lo que se tuvo que acudir al diseño de dos péptidos sintéticos de 16 aminoácidos, que de éste modo mostró su característica inmunógena específica para Der p 1.
4. Los anticuerpos generados a partir de rDer p 2 y los péptidos sintéticos del Der p 1, se mostraron de elevada eficacia en su capacidad de retención de los alérgenos nativos Der p 1 y Der p 2 en cromatografía de afinidad.
5. Se consiguió la purificación, prácticamente a homogeneidad, de los alérgenos Der p 1 y Der p 2 en su forma nativa, a partir del extracto procedente del cultivo del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, mediante cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A-Sepharosa, empleando los antisueros de conejo obtenidos a partir del alérgeno recombinante rDer p 2 y los péptidos sintetizados del alérgeno Der p 1.
6. Se estableció el perfil de seguridad de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, mediante ensayos de toxicidad anormal y capacidad irritante.

7. Se estandarizó, en términos de actividad biológica, la respuesta cutánea a alérgenos Der p 1 y Der p 2, en referencia al extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* completo y desprovisto de los alérgenos Der p 1 + Der p 2.
8. Se determinó, en términos de potencia alergénica, los valores Ag<sub>50</sub> de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, en referencia al extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* completo y desprovisto de los alérgenos Der p 1 y Der p 2.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Aalberse R C, Hoorweg E, Reerink-Brongers EE.** (1975). Interactions between IgE and house dust extract as studied by the radioallergosorbent test (RAST). *Dev Biol Stand.* 29:197-207.
- Aalberse RC.** (1998). Allergens from mites: implications of cross-reactivity between invertebrate antigens. *Allergy*; 53 (Suppl 48):47-48.
- Aalberse, R. C. y van Ree, R.** (2000). Monoclonal Antibody Assays for Allergens: Pick Your Antibodies with Care. *J Allergy Clin Immunol.* 106:625-6.
- Aas K, Backman A, Belin L, Weeke B.** (1978). Standardization of allergen extracts with appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergosorbent tests. *Allergy*; 33:130-7.
- Abbas, A. K., Williams, M. E., Burstein, H. J., Chang, T. L., Bossu, P. y** Extracts with Appropriate Methods. The Combined Use of Skin Prick Testing and Radio Allergosorbent Test. *Allergy* 33, 130-137. **Lichtman, A. H.** (1991). Activation and Functions of CD4+ T-Cell Subsets. 123, 5-22.
- Abraham, S. N. y Arock, M.** (1998). Mast Cells and Basophils in Innate Immunity. *Semin Immunol* 10, 373-381.
- Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Murooka Y, Oka S, Ono K.** (1995). Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosin as a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *J Allergy Clin Immunol*; 96:74-83.
- Allergen Nomenclature.** (1994). Bulletin of the World Health Organization. 72(5):796-806.
- Arnheim, N. y Southern, E. M.** (1977). Heterogeneity of the Ribosomal Genes in Mice and Men. *Cell* 11, 363-370.
- Arshad S, Matthews S, Gant C, Hide D.** (1992). Effect of allergen avoidance on development of allergic disorders in infancy. *Lancet*; 339:1493-1497.
- Arruda K, Vailes L D, Platts-Mills A E, Fernández- Caldas E, Montealegre F, Lin K, Chua K Y, Rizzo M C, Naspitz C K, Chapman M D.** (1997). Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *Am J Respir Crit Care Med*; 155:343-350.
- Baldo B A, Ford S A, Tovey E R.** (1989). Toward a definition of the complete spectrum and rank order of importance of the allergens from the house dust mites: *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Adv Biosci*; 74:13-31.
- Barnes, R. A.** (1990). Zoología de los Invertebrados. 5ª Edición. Ed. Interamericana.
- Baird, B., Sheets, ED., Holowka, D.,** (1999). How Does the Plasma Membrane Participate in Cellular Signaling by Receptors for Immunoglobulin E? *Biophys Chem* 82, 109-119.

- Ball, T. e. a.** (1999). Induction of Antibody Responses to New B-Cell Epitopes Indicates Vaccination Character of Allergen Immunotherapy. *Eur J Immunol* 29, 2026–2036.
- Bennett B J, Thomas W R.** (1996). Cloning and sequencing of the group 6 allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy*;26:1150-1154.
- Bieber, T., de la Salle, H., Wollenberg, A., Hakimi, J., Chizzonite, R., Ring, J., Hanau, D., de la Salle, C.,** (1992). Human Epidermal Langerhans Cells Express the High Affinity Receptor for Immunoglobulin E (Fc $\epsilon$ ri). *J Exp Med* 175, 1285–1290.
- Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H., Kinet, J.P.,** (1989). Complete Structure and Expression in Transfected Cells of High Affinity Ige Receptor. *Nature* 337, 187–189.
- Bousquet, J.** (1998). Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for Allergic Diseases. *Allergy* 53, 1-42.
- Bousquet, J., Lockey, R. y Malling, H. J.** (1998). Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for Allergic Diseases. A Who Position Paper. 102, 558-562.
- Bradford M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Ann Biochem* 72, 248-254.
- Blumenthal M, Bousquet J, Burney P, Burr M. et al.** (1993) Evidence for an increase in atopic disease and possible causes. *Clin Exp Allergy*; 23:484-492.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. y Wiley, D. C.** (1993). Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- Busse, J. E. G. a. W. W.** (2002). Relationship of Viral Infections to Wheezing Illnesses and Asthma. *Nature reviews* 2, 132-138.
- Ceska, M., Lundqvist, U.** (1972). A New and Simple Radioimmunoassay Method for the Determination of Ig E. *Immunochemistry* 9, 102-105.
- Cole, G., Samson,RA.** (1984). The Conidia. Mould allergy Y al-Doory and JF Domson Ch 5 Lea and Febiger Philadelphia, 66-103.
- Constant, S. L., Lee, K. S. y Bottomly, K.** (2000). Site of Antigen Delivery Can Influence T Cell Priming: Pulmonary Environment Promotes Preferential Th2-Type Differentiation. *Eur J Immunol* 30, 840-847.
- Cooke, R. A., Barnard, J. H., Hebald, S. & Stull, A.** (1935). Serological Evidence of Immunity with Coexisting Sensitization in a Type of Human Allergy (Hay Fever). *J Exp Med* 62, 733–750.
- Cookson, W. O., Moffatt, M.F.,** (2000). Genetics of Asthma and Allergic Disease. *Hum Mol Genet* 9, 2359– 2364.

- Costa, J. J., Weller, P. F. y Galli, S. J.** (1997). The Cells of the Allergic Response: Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *Jama* 278, 1815-1822.
- CPMP/BWP/243/96** (1996). Note for Guidance on Allergen Products. Cmpm 13. EMEA.
- Curran, I., Young NM., Burton, M., Vijay, HM** (1993). Purification and Charaterization of Alt a-29 from *Alternaria alternata*. *Int Archiv Allergy Appl Immunology* 102, 267-275.
- Chua K Y, Stewart G A, Thomas W R, Simpson R J, Dilworth R J, Plozza T M, Turner K J** (1988). Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen. Der p 1 homology with cystein proteases. *J Exp Med*, 167:175-182.
- Chua K Y, Doyle CR, Simpson R J, Turner K J, Stewart G A, Thomas W R.** (1990). Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p 2 by Ig E plaque immunoassay. *Int Arch Allergy Appl Immunol*; 91:118-123.
- Chua K Y, Huang C H, Shen H D, Thomas W R.** (1996). Analysis of sequence polymorhism of a major mite allergen, Der p 2. *Clin Exp Allergy*; 26:829-837.
- Derewenda U, Li J, Derewenda Z, Dauter Z, Mueller G A, Rule G S, Benjamín D C.** (2002). The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications. *J Mol Biol*; 318:189-197.
- Dilworth R J, Chua K J, Thomas W R.** (1991). Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der f 1. *Clin Exp Allergy*. 21:25-32.
- Dreborg S.** (1987). The Skin Prick Test. Methodological studies and clinical applications. Linköping University Medical Dissertation. N° 239.
- Durham I, S. C. A., Trowsdale L** (1987). Molecular Mapping of the Human Major Histocompatibility Complex by Pulse-Field Electrophoresis. *Proc Nat Acad Sci USA* 84, 7237-7241.
- Epton M J, Dilworth R J, Smith W, Thomas W R.** (2001). Sensitisation to the lipid-binding apolipophorin allergen Der p 14 and the peptide Mag-1. *Int Arch Allergy Immunol*; 124:57-60.
- Eriksson T L, Johansson E, Whitley P, Schmidt M, Elsayed S, van Hage-Hamsten M.** (1998). Cloning and characterization of a group II allergen from the house dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Eur J Biochem*; 251:443-447.
- Eriksson T L, Withley P, Johansson E, van Hage-Hamsten M, Grafvelin G.** (1999). Identification and characterization of two allergens from the dust mite *Acarus siro*, homologous with fatty acid-binding proteins. *Int Arch Allergy Immunol*; 119:275-281.
- Eriksson T L, Rasool O, Huecas S, Whitley P, Crameri R, Appenzeller U, Gafvelin G, van Hage-Hamsten M.** (2001). Cloning of three new allergens from the dust mite *Lepidoglyphus destructor* using phage surface display technology. *Eur J Biochem*; 268: 287-294.

- Feijen, M., Gerritsen, J., Postma, D.S.,** (2000). Genetics of Allergic Disease. *Br Med Bull* 56, 894-907.
- Ferrandiz R, Casas R, Dreborg S, Einarsson R, Bonachea I, Chapman M** (1995). Characterization of allergenic components from house dust mite *Dermatophagoides siboney*. Purification of Der s 1 and Der s 2 allergens. *Clin Exp Allergy* 25:922-928.
- Fisher K, Holt D C, Harumal P, Currie B J, Walton S F, Kemp D J.** (2003). Generation and characterization of cDNA clones from *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* for an expressed sequence tag library: Identification of homologous of house dust mite allergens. *Am J Trop Med Hyg*; 68:61-64.
- Flores I, Mora C, Rivera E, Donnelly R, Montealegre F.** (2003). Cloning and molecular characterization of a cDNA from *Blomia tropicalis* homologous to dust mite group 3 allergens (trypsin-like proteases). *Int Arch Allergy Immunol*; 130:12-16.
- Folkerts, G., Walzl, G., Openshaw, P.J.,** (2000). Do Common Childhood Infections 'Teach' the Immune System Not to Be Allergic? *Immunol Today* 21, 118-120.
- Furmonaviciene R, Shakib F** (2001). The molecular basis of allergenicity comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif. *J Clin Pathol: Med Pathol*; 54: 155-159
- Galli, S. J., Maurer, M. y Lantz, C. S.** (1999). Mast Cells as Sentinels of Innate Immunity. *Curr Opin Immunol* 11, 53-59.
- Garman, S. C., Kinet, J.P., Jardetzky, T.S.,** (1998). Crystal Structure of the Human High-Affinity IgE Receptor. *Cell* 95, 951-961.
- Gafvelin G, Johansson E, Lundin A, Smith A M, Chapman M D, Benjamín D C, Derewenda U, van Hage-Hamsten M.** (2001). Cross-reactivity studies of a new groupe 2 allergen from the dust mite *Glyciphagus domesticus*, Gly d 2 and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol*; 107:511-518.
- Gershoni, J. M. y Palade, G. E.** (1983). Protein Blotting: Principles and Applications. *Anal Biochem* 131, 1-15.
- Grant, J.** (1992). Fundamentals of the Immune System and Hypersensitivity Reactions. *Allergy, Theory and Practice*, 7-18.
- Green W K, Chua K Y, Stewart G A, Thomas W R.** (1990). Antigenic analysis of groupe I house dust mite allergens using random fragments of Der p 1 expressed by recombinant DNA libraries. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 92:30-38.
- Grunewald, S. M., Werthmann, A., Schnarr, B., Klein, C. E., Brocker, E. B., Mohrs, M., Brombacher, F., Sebald, W. y Duschl, A.** (1998). An Antagonistic Il-4 Mutant Prevents Type I Allergy in the Mouse: Inhibition of the Il-4/Il-13 Receptor System Completely Abrogates Humoral Immune Response

to Allergen and Development of Allergic Symptoms in Vivo. *J Immunol* 160, 4004-4009.

**Harlow, E., Lane, D.** (1988). *Antibodies, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

**Hermanson, G. T., Mallia, A. K. y Smith, P. K.** (1992). *Immobilized Affinity Ligand Techniques* (San Diego, Academic Press).

**Hiller, R. e. a.** (2002). Microarrayed Allergen Molecules: Diagnostic Gatekeepers for Refined Allergy Treatment. *FASEB J Jan 14* (DOI 10.1096/fj.01-0711fje).

**Holgate, S. T., Church, M** (1993). *Allergy Gower medical Publishing. Londres.*

**International Woorkshop Report** (1989): Dust Mite Allergen and asthma. A world wide Problem. *J Allergy Clin Immunol*; 83:416 -27.

**Johansson E, Schmidt M, Johansson S G O, Machado L, Olsson S, van Hage Hamsten M.** (1997): Allergenic cross-reactivity between *Lepidoglyphus destructor* and *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy* 23:117-123.

**Johansson E, Aponno N, Lundberg M, van Hage-Hamsten M.** (2001). Allergenic cross-reactivity between the Nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy*; 56:660-666.

**Jongepier, H., Boezen, H. M., Dijkstra, A., Howard, T. D., Vonk, J. M., Koppelman, G. H., Zheng, S. L., Meyers, D. A., Bleecker, E. R. y Postma, D. S.** (2004). Polymorphisms of the Adam33 Gene Are Associated with Accelerated Lung Function Decline in Asthma. *Clin Exp Allergy* 34, 757-760.

**Kawamoto S, Suzuki T, Aki T, Katsutani T, Tsuboi S, Shigeta S, Ono K.** (2002). Der f 16: A novel gelsolin-related molecule identified as an allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *FEBS letter*; 516:234-238.

**Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S. G. y Trowsdale, J.** (1991). A New Human Hla Class II-Related Locus, Dm. *Nature* 353, 571-573.

**Kent N A, Hill MR, Keen N J, Holland P W H, Hart B J.** (1992). Molecular characterization of group I allergen Eur m 1 from house dust mite *Euroglyphus mainey*. *Int Arch Allergy Immunol* 99:150-152.

**King T P, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh D G, Platts-Mills TAE, Thomas W R.** (1994). Allergen Nomenclature. *Bull World Health Organ* 72: 797-80.

**King C, Simpson RJ, Moritz R L, Reed G L, Thompson P J, Stewart G A.** (1996). The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (Der p 9) from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol*; 98:739-747.



- King C, Brennan S, Thompson PJ.** (1998). Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol*, 161:3645-3651.
- Kinet, J. P.** (1999). The High-Affinity Ige Receptor: (Fc $\epsilon$ ri) from Physiology to Pathology. *Ann Rev Immunol* 17, 931–972.
- Kinet, J. P., Blank, U., Ra, C., White, K., Metzger, H., Kochan, J.,** (1988). Isolation and Characterization of Cdnas Coding for the Beta Subunit of the High-Affinity Receptor for Immunoglobulin E. *Proc Nat Acad Sci USA* 85, 6483–6487.
- Kuehr J, Frischer T, Meinert R, Barth R, Foster J, Schraub S, Urbanek R, Karmaus W.** (1994). Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitisation. *J Allergy Clin Immunol*; 94:44-52.
- Labrada M, Uyema K, Sewer M, Labrada A, González M, Caraballo L, Puerta L.** (2002). Monoclonal antibodies against Blo t 13, a recombinante allergen from *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol*; 129:212-218.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lake F R, Ward L D, Simpson R J, Thompson P J, Stewart G A.** (1991). House dust mite derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterization. *J Allergy Clin Immunol*; 87:1035-1042.
- Lim S H, Chew F T, Ong S T, Tsai L C, Le B E.** (2000). Identification of new *Dermatophagoides* allergens and isoforms from an expressed sequence tag database showing homology to other known allergens. *ACI International*; suppl 2:175.
- Loveless, M. H.** (1940). Immunological Studies of Pollinosis. I. The Presence of Two Antibodies Related to the Same Pollen Antigen in the Serum of Treated Hay-Fever Patients. *J Immunol* 38, 25-50.
- Malling, H.** (1987). Skin Prick Test: Methodological Studies and Clinical Applications. Linköping University Medical Dissertation n° 239.
- Malling,HJ.** (1984). Skin Prick Testing and the use of Histamine References.*Allergy* 39,596-601
- Mc Call C, Hunter S, Stedman K, Weber E, Hillier A, Bozic C, Rivoire B, Olivry T.** (2001). Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Vet Immunol Immunopathol*; 10; 78 (3-4):231-247.
- McFadden, E. R., Jr. y Gilbert, I. A.** (1992). Asthma. *N Engl J Med* 327, 1928-1937.
- McHugh, S. M., Deighton, J., Stewart, A. G., Lachmann, P. J. & Ewan,** (1995). Bee-Venom Immunotherapy Induces a Shift in Cytokine Responses from a Th2 to a Th1 Dominant Pattern: Comparison of Rush and Conventional Immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 25,828-838.

- Metcalfe, D. D., Baram, D. y Mekori, Y. A.** (1997). Mast Cells. *Physiol Rev* 77, 1033-1079.
- Mora C, Flores I, Montealegre F, Díaz A.** (2003). Cloning and expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cystein proteases. *Clin Exp Allergy*. 33:28-34.
- Morgan M S, Arlian L G, Barnes K C, Fernández Caldas E.** (1997). Characterization of the allergens of the house dust mite *Euroglyphus maynei*. *J Allergy Clin Immunol*; 100:222-228.
- Mudde, G. C., Van Reijssen, F. C., Boland, G. J., de Gast, G. C., Bruijnzeel, P. L. y Bruijnzeel-Koomen, C. A.** (1990). Allergen Presentation by Epidermal Langerhans' Cells from Patients with Atopic Dermatitis Is Mediated by Ige. *Immunology* 69, 335-341.
- Noon, L.** (1911). Prophylactic Inoculation against Hay Fever. *Lancet* 1, 1572-1573.
- O'Neill GM, Donovan G R, Baldo B A.** (1994). Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferasa. *Bioch Biophys Acta Gene Struct Expression*; 1219:521-528.
- Osterballe, O., Week, B.** (1979). A New Lancet for Skin Prick Testing. *Allergy* 34, 209-212.
- Ovsyannikova I G, Vailes L D, Li Y, Heymann P V, Chapman M D.** (1994). Monoclonal antibodies to group II *Dermatophagoides spp.* allergens: Murine immune response, epitope analysis, and development of the two-site ELISA. *J Allergy Clin Immunol*; 94:537-546.
- Paul, W. E., Seder, R. A. y Plaut, M.** (1993). Lymphokine and Cytokine Production by Fc Epsilon Ri+ Cells. *Adv Immunol* 53, 1-29.
- Platts - Mills TAE, Vervloet D, Thomas W R, Aalberse R C.** (1997). Indoor allergens and asthma: Report of the Third International Workxhop. *J Allergy Clin Immunol*; 100: S1 - S24.
- Puerta L, Caraballo L, Fernández-Caldas E, Avjioglu A, Marsh D G, Lockey R F, Dao M L.** (1996). Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for a *Blomia tropicalis* allergen. *J Allergy Clin Immunol*; 98: 932-937.
- Puerta L, Kennedy M, Jimenez S, Caraballo L.** (1999). Structural and ligand binding analysis of recombinant Blo t 13 allergen from *Blomia tropicalis* mite, a fatty acid binding protein. *Int Arch Allergy Appl Immunol*; 119:181-184.
- Ramos J, Nge C, Wah L B, Chua K Y.** (2001). cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *Int Arch Allergy Immunol*; 126:286-293.
- RFE** (1997). 2.5.12; Determinación De Agua:Semimicrodeterminación. 68.

- Rocklin, R. E., Sheffer, A., Greineder, D. K. & Melmon, K. L.** (1980). Generation of Antigen-Specific Suppressor Cells During Allergy Desensitization. *N Engl J Med* 302, 1213-1219.
- Romagnani, S.** (1997). Atopic Allergy and Other Hypersensitivities Interactions between Genetic Susceptibility, Innocuous and/or Microbial Antigens and the Immune System. *Curr Opin Immunol* 9, 773-775.
- Romagnani, S.** (2004). Immunologic Influences on Allergy and the Th1/Th2 Balance. *J Allergy Clin Immunol* 113, 395-400.
- Saini, S. S., Klion, A. D., Holland, S. M., Hamilton, R. G., Bochner, B. S. y Macglashan, D. W., Jr.** (2000). The Relationship between Serum Ige and Surface Levels of Fcepsilon<sub>r</sub> on Human Leukocytes in Various Diseases: Correlation of Expression with Fcepsilon<sub>r</sub> on Basophils but Not on Monocytes or Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 106, 514-520.
- Schafer-Nielsen, C., Svendsen, P. J. y Rose, C.** (1980). Separation of Macromolecules in Isotachophoresis Systems Involving Single or Multiple Counterions. *J Biochem Biophys Methods* 3, 97-128.
- Shen, H., Wang, SR., Tang, RB. y cols** (1988). Identification of Allergen and Antigen of Bermuda-Grass Pollen by Immunoblott Analysis. *Clin Allergy* 18, 401-410.
- Shen H D, Chua K Y, Lin W L, Hsieh K H, Thomas W R.** (1995). Molecular cloning and immunological characterization of the house dust mite allergen Der p 7. *Clin Exp Allergy*; 25:1000-1006.
- Smith, D. H., Malone, D.C., Lawson, K.A., Okamoto, L.J., Battista, C., Saunders, W.B.,** (1997). A National Estimate of the Economic Costs of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 787-793.
- So, A.** (1994). Genetics, Polymorphism and Regulation of Expresion of HLA Region Genes. *HLA and Disease*. Lechler (Ed) San Diego, CA Academic Press Inc.
- Schulz O, Laing P, Sewell H F, Shakib F** (1995). Der p 1 a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for the human IgE (CD23). *Eur J Immunol*. 25:3191-3194.
- Schulz O, Sewell H F, Shakib F.** (1998). Proteolytic cleavage of CD25, the 5 subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med*. 187(2):271-275.
- Stanaland B, Fernández-Caldas E, Jacinto C M.** (1994). Sensitization to *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy*; 94:452-457.
- Stewart G A, World L D, Simpson R J, Thompson P J.** (1992). The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme. *J. Immunol*; 75:29-35.
- Stewart G A, Thompson P J.** (1996). The biochemistry of common aerollergens. *Clin Exp Allergy*; 26:1020-1044.

- Tategaki A, Kawamoto S, Aky T, Jyo T, Suzuki O, Shigeta S, Ono J.** (2000). Newly described house dust mite allergens. *ACI Int*; suppl 1:64-66.
- Thomas W R, Chua K Y.** (1995). The major mite allergen Der p 2. A secretion of the male mite reproductive tract?. *Clin Allergy*; 25:660-669.
- Tovey E R, Chapman M D, Platts - Mills T A E** (1982). Mite feces are a major source of house dust allergens. *Nature* 289: 592-593.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J.** (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. 76, 4350-4354.
- Tsai L C, Chao P, Hung M W, Sun Y C, Kuo I C, Chua K Y, Liaw S H.** (2000). Protein sequence analysis and mapping of Ig E and Ig G epitopes of an allergenic 98 kDa *Dermatophagoides farinae* para myosin, Der f 11. *Allergy*; 55:141-147.
- Turner, H. y Kinet, J. P.** (1999). Signalling through the High-Affinity Ige Receptor Fc Epsilonri. *Nature* 402, B24-30.
- Valenta, R.** (2002). The Future of Antigen-Specific Immunotherapy of Allergy. 2, 446-453.
- Valenta, R. e. a.** (1991). Identification of Profilin as a Novel Pollen Allergen; Ige Autoreactivity in Sensitized Individuals. *Science* 253, 557-560.
- Van Eerdewegh, P., Little, R. D., Dupuis, J., Del Mastro, R. G., Falls, K., Simon, J., Torrey, D., Pandit, S., McKenny, J., Braunschweiger, K. y cols.** (2002). Association of the Adam33 Gene with Asthma and Bronchial Hyperresponsiveness. *Nature* 418, 426-430.
- Van Hage-Hamsten M, Johansson S G, Johansson E, Wiren A.** (1987). Lack of allergenic cross-reactivity between storage mites and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Allergy*; 17:23-31.
- Van Neerven, R. J. e. a.** (1999). Blocking Antibodies Induced by Specific Allergy Vaccination Prevent the Activation of Cd4+ T Cells by Inhibiting Serum-Ige-Facilitated Allergen Presentation. *J Immunol* 163, 2944-2952.
- Van Ree, R.** (2000). A New Start for Allergen References and Standarzitation Based on Purified (Natural and Recombinant) Allergens Nd Monoclonal and Monospecific Polyclonal Antibodies. Regulatory Control and standarzitation of allergenic extracts. Darsmstadt, Germany: GIT Verlag, 87-92.
- van Ree, R. y Aalberse, R. C.** (1999). Specific Ige without Clinical Allergy. 103, 1000-1001.
- van Ree, R., Van Leeuwen WA, Aalberse RC** (1998). How Far Can We Simplfy in Vitro Diagnostics for Grass Pollen Allergy? A Estudy with 17 Pollen Extracts and Purified Natural and Recombinant Allergens. *J Allergy Clin Immunol* 102, 184-190.

- van Ree, R. e. a.** (1996). False-Positive Skin-Prick Test Responses to Commercially Available Dog-Dander Extracts Caused by Contamination with House Dust Mite *Dermatophagoides Pteronyssinus*) Allergens. *J Allergy Clin Immunol* 98, 1028-1034.
- Venturi, M., Rimón, A., Gerchman, Y., Hunte, C., Padan, E. y Michel, H.** (2000). The Monoclonal Antibody 1f6 Identifies a Ph-Dependent Conformational Change in the Hydrophilic Nh(2) Terminus of Nhaa Na(+)/H(+) Antiporter of *Escherichia Coli*. 275, 4734-4742.
- von Hertzen, L. C.** (2000). Puzzling Associations between Childhood Infections and the Later Occurrence of Asthma and Atopy. *Ann Med* 32, 397-400.
- Voorhorst R, Spiekma FThM, Varekamp H.** (1969). House-dust atopy and the house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Leiden: Stafleu.
- Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C. P. y Guggenmoos-Holzmänn, I.** (1997). Indoor Allergen Exposure Is a Risk Factor for Sensitization During the First Three Years of Life. *J Allergy Clin Immunol* 99, 763-769.
- Wardlaw, A. J., Moqbel, R. y Kay, A. B.** (1995). Eosinophils: Biology and Role in Disease. *Adv Immunol* 60, 151-266.
- Webber, K., Osborn, H.** (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-4411.
- Wide, L., Bennich, H., Johansson, SGO.** (1967). Diagnosis of Allergy by an in Vitro Test for Allergen Antibodies. *Lancet II*, 1105-1107.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J. y Karp, C. L.** (2001). The Germless Theory of Allergic Disease: Revisiting the Hygiene Hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1, 69-75.
- Wittman A M, Akkerdaas J H, van Leeuwen, van der Zee J S, Alberse R C.** (1994). Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *Int Arch Allergy Immunol*; 105:56-61.
- Wittman A M, van der Oudenrijn S, van Leeuwen J, Akkerdaas J, van der Zee J S, Alberse R C.** (1995). Ig E antibodies reactive with silverfish, cockroach and chironomid are frequently found in mite-positive allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*; 108:165-169.
- Yasueda H, Mita H, Akiyama A et al.** (1993). Allergens from *Dermatophagoides mites* with chymotryptic activity. *Clin Exp Allergy*; 23:384-390.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G. y van Ree, R.** (2002). Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science* 296, 490-494.
- Yi F C, Cheong N, Shek P C, Wang D Y, Chua K Y, Lee B W.** (2002). Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly

conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin Exp Allergy; 32:1203-1210.

**Ying, S., Humbert, M., Barkans, J., Corrigan, C.J., Pfister, R., Menz, G., Larche, M., Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B.,** (1997). Expression of Il-4 and Il-5 Mrna and Protein Product by Cd4<sup>+</sup> and Cd8<sup>+</sup> T Cells, Eosinophils, and Mast Cells in Bronchial Biopsies Obtained from Atopic and Nonatopic (Intrinsic) Asthmatics. J Immunol 158, 3539-3544.



